

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Biología y control de la garrapata *Hyalomma lusitanicum*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julia González González

Directores

Ángeles Sonia Olmedo García
Félix Valcárcel Sancho

Madrid
Ed. electrónica 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Biología y Control de la Garrapata

Hyalomma lusitanicum

Tesis Doctoral

Julia González González

Directores

Dra. Ángeles Sonia Olmeda García

Dr. Félix Valcárcel Sancho

Madrid, 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Biología y Control de la Garrapata

Hyalomma lusitanicum

Memoria presentada por

Julia González González

Para optar al Grado de Doctor

Bajo la Dirección de

Dra. Ángeles Sonia Olmeda García

Dr. Félix Valcárcel Sancho

Madrid, 2018

Agradecimientos

Es el último apartado que se escribe y el primero que se lee, pero siempre lo recuerdas porque resume toda esa experiencia que supone hacer una tesis doctoral. Para mí, han sido cinco años de aprendizaje personal y profesional, donde he tenido la suerte de colaborar con gente muy buena:

Mis directores, Sonia y Félix, que confiaron en mí desde el principio y me dejaron formar parte de este equipo. Me habéis contagiado vuestra motivación por este trabajo *garrapatero*. Gracias por enseñarme tanto, por apoyarme y dejarme poner en práctica ideas absurdas que no resultaron ser, pero valió la pena intentar. Sin vosotros no habría conseguido nada de esto, así que muchas gracias por todo.

José María, mi tercer director (extraoficialmente), que me dio la oportunidad de trabajar en la finca “La Garganta” rodeada del mejor ambiente posible. Gracias por escucharme y dejarme aprender de tu experiencia en el campo. Sin tus consejos, esta tesis no tendría el mismo sentido.

El personal de la finca: Ángel, Antonio, Valentín, Domingo, Juan, Paco(s), José Ángel.... Y un largo etcétera. Muchísimas gracias por hacerme sentir siempre como en casa. Vuestra ayuda y buen humor han sido fundamentales en cada muestreo y viaje en coche. Me llevo más de mil fotos de vosotros y un montón de recuerdos difíciles de olvidar.

María, creo que, si no hubieras venido, seguiría contando aquellos botes de verano (...); gracias por tu ayuda, las canciones *jits* de ayer, hoy y siempre, y esas anécdotas de echarte a reír y perder la cuenta. También tengo que darle las gracias a Ana Tercero, por su tiempo y su trabajo, siempre dispuesta a echar una mano.

Las chicas de Lupe: Ana, Rocío, Rosa, Valentina, Juliana y Juanpe (el chico alfa), además de todos los internos majísimos que han pasado por allí. Os debo muchos cafés. Gracias por acogerme desde el primer día, por sacarme del laboratorio para charlar entre *tuppers*, cafés y cualquier otra excusa. Siempre me habéis escuchado y apoyado. Me habéis dejado entretenerme con vuestros flebotomos, pulgas y garrapatas nortañas, además de resolverme infinidad de

dudas veterinarias y otras no tan científicas. Me quedo con vuestros sabios consejos y muchos recuerdos de mudanzas y congresos.

Miguel, mi *compi* (doctor *compi* ya). Gracias por cuidarme siempre, por escucharme y contagiarme tu positividad, por estar sin estar con tus geniales *post-its*.

La gente currante del departamento de Sanidad Animal de la facultad: Reyes, Vicente, Pascual, Agustín, Flora... Gracias por vuestro trabajo diario y vuestra paciencia.

Las chicas de la biblioteca, Mar y Carmen. Muchísimas gracias por viajar en el tiempo y el espacio para traerme artículos de los años 30 desde cualquier rincón del mundo. Vuestro trabajo ha sido fundamental para completar la bibliografía de esta tesis.

Investigadores del departamento, como Aránzazu Meana y Guadalupe Miró, que me han ayudado siempre que lo he necesitado con su experiencia. Especialmente, Maite Cutuli, con quien he trabajado mucho y aprendido todo lo que sé de los hongos entomopatógenos.

Otros investigadores con los que he colaborado estos años, aunque ese trabajo no se haya podido incluir en esta tesis. Raquel Martín, gracias por traducirme el mundo molecular. Azucena González y María Fe de Andrés, muchas gracias por dejarme aprender de vuestra química natural y rodearme de vuestro genial equipo (Estefanía, Fer, Paula, Rubén, Álvaro, Lucía, Eva...).

Mucha gente del departamento de Reproducción del INIA, mi segundo laboratorio. María, Silvia, Toñi, Pilar, el equipazo de las perdices... gracias por vuestro tiempo y ese buen humor que hay que tener para el manejo de ciertos bichos; he aprendido mucho.

Óscar y María Ángeles del CISA, gracias por todos los cafés compartidos. Tampoco me puedo olvidar de Ana Aguilar, porque le he robado muchos de fines de semana para la alimentación artificial de garrapatas (creo que te debo demasiadas cañas).

Mis biólogos: Maca, Sarai, Luciana, Óscar y Lola. Gracias por escucharme, vía telemática o presencial, y sacarme de casa para resolver dudas existenciales entre cañas y cenas en Madrid,

Barcelona, Alicante, Sevilla, Cerdeña o donde quiera que planeemos ir; especialmente a Lola, porque nuestras tesis han sido paralelas y, cuando el momento lo ha requerido, no ha dudado en aguantar una caña más o planear una huida en año par/impar a cualquier lugar. Nos hemos reído por nada y luchado por todo, ¡ya sólo nos queda celebrar y re-celebrar!

Mis amigos de siempre: Isa, Laura, Ana(s), Vicky y Miki. Gracias por animarme siempre y organizar salidas de manirrota, quedadas en el Tranvía y fiestas de barrio, donde todo vale y las anécdotas son el mejor recuerdo. Sobre todo, a mi compi de piso Ana, que se ha llevado todos los cambios de humor de esta tesis y me ha hecho de niñera perruna cuando lo he necesitado; gracias por esas cenas de serie y vasodilatador.

Mi familia. Gracias a mis padres por enseñarme, con su ejemplo, que el trabajo siempre tiene recompensa; me habéis dado la fuerza para conseguir todo lo que me he propuesto. A Leo, por sus charlas de valientes, que tantas veces me han dado la confianza que necesito. Y, por supuesto, a mi hermana Marta, compi de trabajo, además, en los últimos años; ¿qué te voy a decir? nos entendemos sin hablarnos, siempre estás ahí, aguantando mis crisis con los mejores consejos para seguir adelante y disfrutar también de lo que es más importante, como esa pequeña gran revolución. Gracias a los cinco por tanto.

Por último, quiero agradecer a Su Gracia el Duque de Westminster el apoyo incondicional para la realización de esta tesis doctoral.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica	5
2.1. Biología de las Garrapatas.....	7
2.1.1. Encuadre taxonómico y evolución	
2.1.2. Características de la morfología externa de los ixódidos	
2.1.3. Ciclos biológicos	
2.1.4. Factores que influyen en el ciclo biológico	
2.1.5. Distribución y características de las garrapatas del bosque mesomediterráneo	
2.2. Métodos de Estudio	34
2.2.1. Recogida de garrapatas en vegetación y animales	
2.2.2. Mantenimiento en condiciones de laboratorio y alimentación artificial	
2.3. Control de Garrapatas	44
2.3.1. Prácticas tradicionales	
2.3.2. Control químico	
2.3.3. Control biológico	
2.3.4. Control integrado	
3. Justificación y Objetivos.....	61
4. Material y Métodos	65
4.1. Zona de Estudio	67
4.2. Recogida e Identificación de Garrapatas	69
4.2.1. Muestreos en vegetación	
4.2.2. Muestreos en animales	
4.2.3. Identificación y recuento de ejemplares	
4.3. Estudio de las Garrapatas en el Laboratorio.....	73
4.3.1. Mantenimiento de la colonia	
4.3.2. Alimentación artificial	
4.4. Control de la Población de Garrapatas en un Ecosistema Mesomediterráneo	77
4.4.1. Control biológico: Hongos entomopatógenos	

4.4.2. Manejo de hospedadores: Exclusión de ungulados	
4.5. Análisis Estadístico	81
5. Publicaciones	83
5.1. Long-Term Ecological Study of Host-Seeking Adults of <i>Hyalomma lusitanicum</i> (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean Climate (Estudio a Largo Plazo de los Adultos en Búsqueda Activa de <i>H. lusitanicum</i> en un Clima Mesomediterráneo)	85
5.2. Long Term Study of Ixodid Ticks Feeding on Red Deer (<i>Cervus elaphus</i>) in a Meso-Mediterranean Climate (Estudio a Largo Plazo de los Ixódidos que se Alimentan del Ciervo en un Clima Mesomediterráneo)	89
5.3. Seasonal Dynamics of Ixodid Ticks on Wild Rabbits <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Leporidae) from Central Spain (Dinámica Estacional de los Ixódidos del Conejo Silvestre en la Zona Centro de España)	101
5.4. In vitro feeding of <i>Hyalomma lusitanicum</i> ticks on artificial membranes (Alimentación <i>in vitro</i> de Garrapatas <i>H. lusitanicum</i> con Membranas Artificiales)	113
5.5. Control of <i>Hyalomma lusitanicum</i> (Acari: Ixodidae) Ticks Infesting <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Lagomorpha: Leporidae) Using the Entomopathogenic Fungus <i>Beauveria bassiana</i> (Hyocreales: Clavicipitaceae) in Field Conditions (Control de la Garrapata <i>H. lusitanicum</i> que Parasita al Conejo Silvestre Mediante el Hongo Entomopatógeno <i>B. bassiana</i> en Condiciones de Campo)	124
5.6. The effect of excluding ungulates on the abundance of ixodid ticks on wild rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) (El Efecto de Excluir Ungulados en la Abundancia de Ixódidos del Conejo Silvestre)	131
6. Resultados y Discusión General	141
6.1. Fenología de las Garrapatas Mesomediterráneas	143
6.2. Adaptación de la Técnica Alimentación Artificial a la Especie <i>H. lusitanicum</i>	150
6.3. Control de la Población de Garrapatas Mesomediterráneas	153
7. Conclusiones	159
8. Resumen y Abstract	163
9. Bibliografía	169
10. Anexos	203

1. Introducción

La importancia de las garrapatas como vectores se ha multiplicado exponencialmente en las últimas décadas. Aunque su papel en la transmisión de patógenos fue uno de los primeros en ser descrito (Babes 1888; Theiler 1912), no obtuvo el foco de interés de la salud pública mundial, hasta que en los años 70 del siglo pasado se produjo el primer brote de la enfermedad de Lyme. A partir de entonces, se han producido numerosas alertas relacionadas con este ácaro que es, tras los mosquitos, el principal vector biológico, en el que los agentes se multiplican, desarrollan o sobreviven tras milenios de co-evolución. Esta antigua asociación es, en muchos casos, anterior a la propia especiación de la garrapata. Así, los patógenos de un área concreta pueden ser previamente definidos en función de las especies de garrapatas presentes.

La Península Ibérica, puente entre dos continentes, constituye una situación única en la que coexisten, según la zona, especies de garrapatas comunes en el resto de Europa y especies autóctonas de clima mediterráneo. En esta situación, los patógenos que transmiten son también muy variados. Teniendo en cuenta exclusivamente las infecciones de interés en salud pública, se han identificado agentes zoonóticos, tales como, *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia* spp., *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp. y, recientemente, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (De la Fuente y col. 2004; Toledo y col. 2009a, b; Estrada-Peña y col. 2012; Fernández de Mera y col. 2013). Algunos de estos agentes producen enfermedades ampliamente conocidas en nuestro país, como la fiebre botonosa mediterránea (BOE 1996), o la fiebre Q (de Prada y Llorente 1950; Sobradillo y col. 1986), mientras que otras están de actualidad, lamentablemente, como la fiebre hemorrágica Crimea-Congo (ECDC 2016).

En general, la incidencia y distribución geográfica de las enfermedades transmitidas por garrapatas ha aumentado como consecuencia de un proceso multifactorial que incluye el cambio climático, ecológico y social, lo que condiciona el mayor riesgo de exposición a las garrapatas infectadas (Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

Dado el alto grado de adaptación de los agentes a su garrapata-vector, y de ésta a sus hospedadores y al medio, es muy difícil establecer una única medida que evite el riesgo de transmisión. Conscientes de esta situación, la tendencia actual sugiere la necesidad de establecer un control integrado mediante distintas estrategias, para lograr mantener el riesgo dentro de un límite razonable (Stafford y col. 2017). El éxito del control depende, en parte, del desarrollo de

métodos específicos, ya que cada garrapata tiene sus propios requerimientos fisiológicos, con ciclos de uno o más hospedadores, de igual o diferente especie, y se adapta a distintas condiciones ambientales. Por tanto, para establecer cualquier medida preventiva es fundamental conocer las especies de garrapatas de una zona concreta y su fenología, definir la intensidad de exposición de los hospedadores y la situación geográfica y climática.

Hoy en día, los métodos de control clásicos, basados fundamentalmente en el uso excesivo de acaricidas y repelentes, están dando lugar a alternativas más ecológicas, que reducen el impacto ambiental, y resuelven, además, el problema de las resistencias utilizando productos naturales y nuevos métodos de aplicación (Benelli y col. 2016).

En el presente trabajo se plantea el control de *H. lusitanicum*, la especie más abundante, en una finca de gestión ecológica de clima mesomediterráneo.

2. Revisión Bibliográfica

2.1. Biología de las Garrapatas

2.1.1. Encuadre taxonómico y evolución

2.1.2. Características de la morfología externa de los ixódidos

2.1.3. Ciclos biológicos

2.1.4. Factores que influyen en el ciclo biológico

2.1.5. Distribución y características de las garrapatas del bosque mesomediterráneo

2.2. Métodos de Estudio

2.2.1. Recogida de garrapatas en vegetación y animales

2.2.2. Mantenimiento en condiciones de laboratorio y alimentación artificial

2.3. Control de Garrapatas

2.3.1. Prácticas tradicionales

2.3.2. Control químico

2.3.3. Control biológico

2.3.4. Control integrado

2.1. Biología de las Garrapatas

2.1.1. Encuadre Taxonómico y Evolución

Las garrapatas son artrópodos arácnidos incluidas en la subclase Acari, y el orden Ixodida (Metastigmata para algunos autores) que se engloba dentro del superorden Parasitiformes. Por sus características biológicas, se agrupan en tres familias, Nuttalliellidae, Argasidae (conocidas como garrapatas blandas) e Ixodidae (también llamadas garrapatas duras) (Tabla 2.1). Cada familia comprende distintos géneros y especies que forman parte de una clasificación, variable aún hoy en día, en función de la identificación morfológica e interpretación filogenética con métodos moleculares. En este apartado se exponen las distintas teorías sobre la historia evolutiva de las garrapatas que han conducido a la clasificación actual.

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Chelicerata
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Superorden	Parasitiformes
Orden	Ixodida
Superfamilia	Ixodoidea
Familias	Nuttalliellidae
	Argasidae
	Ixodidae

Tabla. 2.1. Clasificación taxonómica actual de las garrapatas (NCBI 2018)

Tradicionalmente, la historia evolutiva de estos artrópodos se ha basado en la asociación con sus hospedadores, sin embargo, los estudios filogenéticos posteriores señalaron el importante papel de la ecología y el hábitat en esta asociación (Klompen y col. 1996).

La mayor parte de los estudios iniciales sobre la evolución de las garrapatas fueron descritos en los más de 400 trabajos publicados por Harry Hoogstraal. La hipótesis de Hoogstraal y Aeschlimann (1982) sitúa el origen de las garrapatas en el Paleozoico tardío (hace aproximadamente 225 millones de años), como parásitos obligados de reptiles, que darían lugar a las tres familias que se conocen actualmente (Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae). Según el

árbol filogenético de Hoogstraal (Fig. 2.1), los argásidos serían un grupo monofilético subdividido después en Argasinae (*Argas*) y Ornithodorinae (*Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola*, y *Nothoaspis*). Por su parte, la familia Ixodidae daría lugar a varias subfamilias, con un grupo basal Prostriata (*Ixodes*), diferenciado por ciertas características del grupo Metastriata, que incluiría la subfamilia Amblyomminae (formada por *Amblyomma* y *Aponomma*), Haemaphysalinae (*Haemaphysalis*), Hyalomminae (*Hyalomma*), y la subfamilia más reciente, Rhipicephalinae, con ocho géneros (*Dermacentor*, *Cosmiomma*, *Rhipicentor*, *Rhipicephalus*, *Anomalohimalaya*, *Nosomma*, *Boophilus* y *Margaropus*).

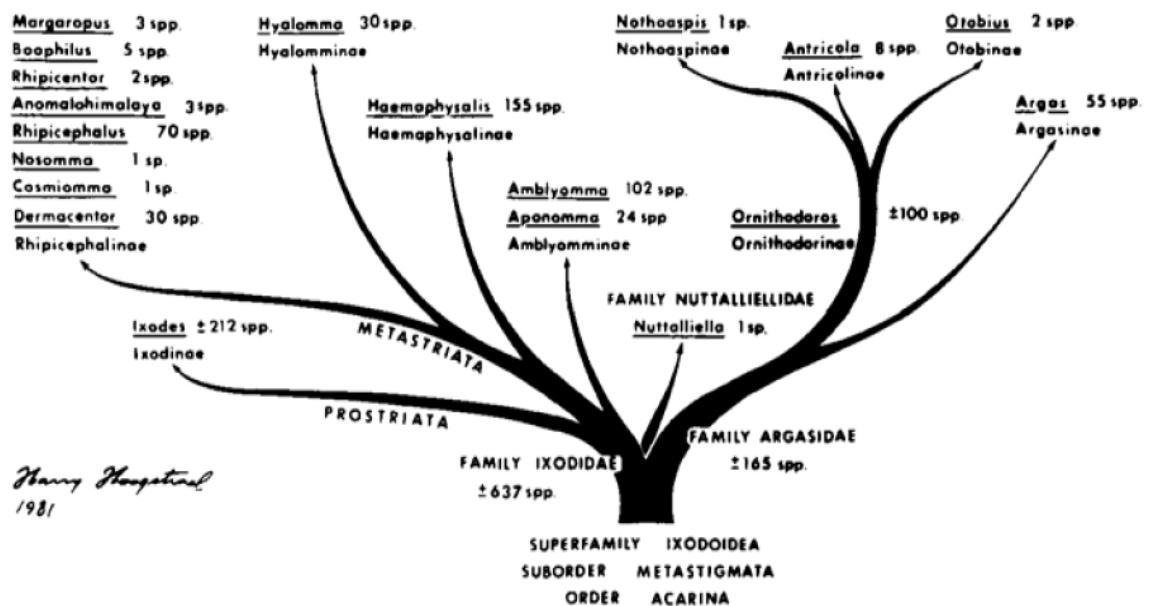


Fig. 2.1. Árbol filogenético según la hipótesis de Hoogstraal (Hoogstraal y Aeschlimann 1982)

Según Hoogstraal y sus colaboradores, las subfamilias de Ixodidae se habrían diversificado según ciertas modificaciones de la estructura del aparato bucal y las coxas, asociadas con la adaptación a sus hospedadores. Estos autores defendían la co-especiación entre parásito y hospedador, es decir, creían en una evolución paralela entre ambos. Según dicha hipótesis (Hoogstraal 1985 citado por Klompen y col. 1996), a partir del Paleozoico tardío, las primeras garrapatas, parecidas a los actuales argásidos, habrían desarrollado una estructura corporal externa muy especializada y adaptada a los hospedadores de entonces, descritos como reptiles de movimiento lento y piel suave. El grupo Prostriata sería el primer linaje en diferenciarse, y entre las subfamilias Metastriata, Amblyomminae y Haemaphysalinae se diversificarían parasitando a los reptiles durante el Triásico y el Jurásico. La subfamilia Hyalomminae sería uno de los grupos mejor adaptados, que sobreviviría a ambientes hostiles con baja densidad de

hospedadores durante el Cretácico, cuando tuvo lugar una extinción masiva de la mayoría de los animales; por último, la subfamilia Rhipicephalinae no evolucionaría hasta la era Cenozoica con la proliferación de los mamíferos. No obstante, para otros autores que siguieron esta teoría como base (citados por Klompen y col. 1996), los reptiles no fueron los hospedadores ancestrales; según Pomerantsev, para el grupo Ixodidae fueron las aves o los mamíferos, sin embargo, Filippova creía que las garrapatas duras se habían originado con los monotremas y marsupiales en el Cretácico. Estudios posteriores discutieron el grado de adaptación de las garrapatas a sus hospedadores, poniendo en duda la evolución por co-especiación mientras sugerían la importancia de la biogeografía y la ecología en la asociación garrapata-hospedador (Klompen y col. 1996). Klompen y colaboradores (2000) propusieron otra filogenia basada en los caracteres morfológicos y moleculares, donde todas las garrapatas partían también de un antecesor similar a los argásidos, pero en el Cretácico tardío (hace aproximadamente 120 millones de años), tras la ruptura de la placa Gondwana y la separación de Australia, destacando así el papel de la biogeografía en la evolución. Actualmente, muchos autores apoyan la importancia que tuvieron los movimientos de las placas tectónicas y los cambios globales a gran escala en el medio ambiente para producir la gran diversidad de garrapatas (Chitimia-Dobler y col. 2017; Sands y col. 2017), aunque las evidencias recopiladas sugieren que muchas de las divisiones de linaje se produjeron cuando las masas continentales aún formaban Pangea o Laurasia-Gondwana (Estrada-Peña y de la Fuente 2018).

No obstante, la historia evolutiva de las garrapatas y su sistemática sigue variando, teniendo en cuenta distintos caracteres morfológicos, la relación con los hospedadores, y la biogeografía que las engloba, aspectos a los que se suman los avances genéticos y moleculares (Durden y Beati 2014). Gracias a las nuevas técnicas, se ha determinado por estudios morfológicos y moleculares que la única especie de la familia Nuttalliellidae, *Nuttalliella namaqua*, es posiblemente el taxón existente más cercano al linaje ancestral de las garrapatas (Mans y col. 2011, 2012), aunque su filogenia continua siendo incierta todavía. Estos avances han permitido que se hayan producido cambios en la reconstrucción de la filogenia de las garrapatas (Fig. 2.2), que incluyen la desaparición del género *Aponomma*, cuyas especies están ahora incluidas entre el género *Amblyomma* y una nueva subfamilia en consideración, Bothriocrotoninae (con un solo género: *Bothriocroton*), establecida como linaje basal de las garrapatas australianas; la inclusión de los géneros de la antigua subfamilia Hyalomminae dentro de la familia

Rhipicephalinae; y la posibilidad de que el género *Ixodes* pueda ser un grupo monofilético (Barker y Murrell 2004).

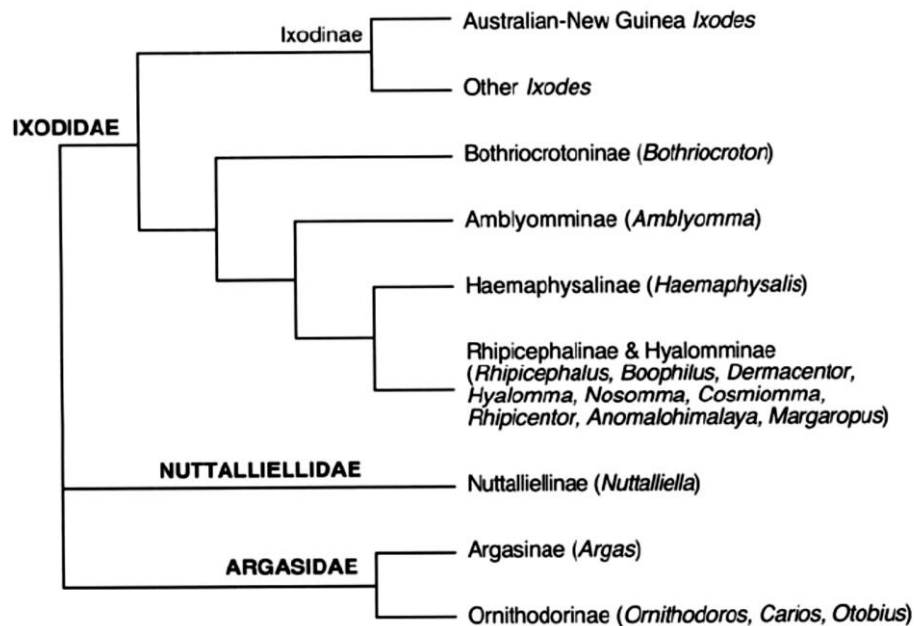


Fig. 2.2. Árbol filogenético propuesto por los análisis de secuenciación (Barker y Murrell 2004)

El registro fósil podría aportar una valiosa pista sobre la evolución de las garrapatas, sin embargo, su eficacia está limitada por el hecho de que la preservación de muchos ejemplares se encuentra en ámbar, una resina extraída de coníferas y otros árboles del periodo Carbonífero (hace entre 280-345 millones de años), por lo que no existen ejemplares anteriores de garrapatas (De la Fuente 2003). El escaso registro fósil demuestra la presencia ancestral de Argasidae, como defienden las últimas teorías de la evolución de los principales linajes (Estrada-Peña y de la Fuente 2018); la división postulada de Prostriata-Metastriata hace aproximadamente 251-201 millones de años es compatible con el registro fósil analizado por De la Fuente (2003) y algunos de los argumentos proporcionados por Chitimia-Dobler y colaboradores (2017). El último fósil, encontrado en España recientemente, podría suponer un cambio en el escenario (Peñalver y col. 2017), ya que sitúa el ejemplar de garrapata más antiguo del mundo 99 millones de años atrás, en el Cretácico, parasitando dinosaurios emplumados. La descripción de este ejemplar, englobado en una polémica nueva familia (Deinocrotonidae), parece relacionarlo con la familia Nuttalliellidae (Fig. 2.3), pero algunos detalles (como la morfología del surco anal) hacen que esta garrapata pueda ser un posible predecesor de Prostriata, lo que cambiaría la evolución de las garrapatas planteada hasta ahora (Estrada-Peña y de la Fuente 2018). Por tanto, el limitado

número de fósiles disponible y la dificultad de examinar los ejemplares hallados aportan información relevante, pero no definitiva para establecer la filogenia.

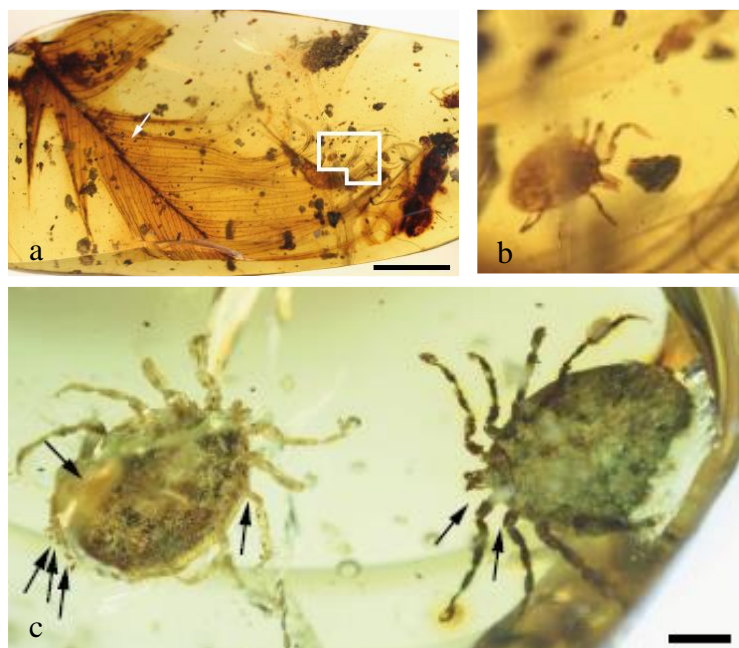


Fig. 2.3. Registro fósil del trabajo de Peñalver y colaboradores (2017). (a) Fotografía de la pieza fósil de ámbar encontrada que muestra una pluma penácea semicompleta con una garrapata dura enredada (barra de escala: 5 mm); (b) Detalle de la garrapata en la vista dorsal (recuadro de la fotografía (a)); (c) Morfología de la nueva familia de garrapatas Deinocrotonidae: holotipo (izquierda) y paratipo en vista ventral (barra de escala: 1 mm).

Como exponen Mans y colaboradores (2016), las principales agrupaciones de las subfamilias de argásidos y de las garrapata duras Prostriata y Metastriata están definidas, pero las relaciones entre ellas y el origen monofilético de los géneros y subgéneros es incierta todavía. En la reconstrucción de la filogenia de las garrapatas (Fig. 2.4) hay que considerar el papel taxonómico de ciertas especies fundamentales, como *Nuttalliella namaqua*, entre otras, a pesar de que no tengan importancia económica o vectorial, ya que su estudio mejora la comprensión de la biología y su evolución. El análisis de la evolución de los caracteres implicados en la alimentación hematófaga indica que la mayoría de ellos estaban presentes en el linaje ancestral de las familias de garrapatas duras o blandas (Mans y col. 2012). El origen previo fue una alimentación por saprofagia, a partir de la que evolucionaron para alimentarse de descamaciones cutáneas o de secreciones o heridas, hasta desarrollar estructuras para atravesar la piel del hospedador (Balashov 2006). Para ello, tuvieron que adaptarse a un sistema

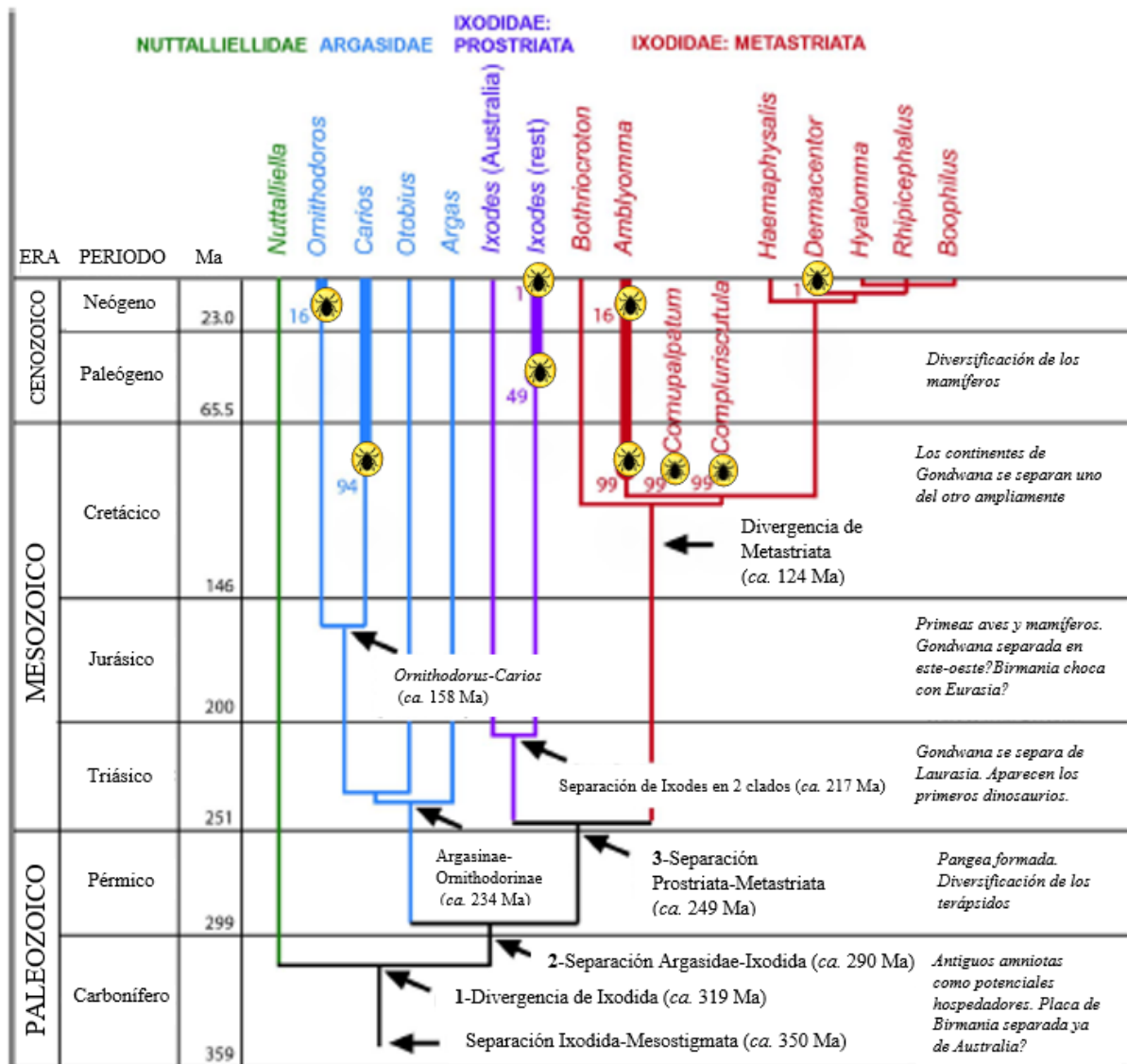


Fig. 2.4. Árbol filogenético basado en el trabajo de Chitimia-Dobler y colaboradores (2017) con el registro fósil de los géneros principales señalados con un icono de garrapata y sus fechas de origen estimadas en millones de años (Ma).

hemostático complejo, desarrollando evolutivamente una gran variedad de mecanismos anti-hemostáticos salivales, como la coagulación de la sangre y los inhibidores de la agregación plaquetaria (Ribeiro 1995, Mans y Neitz 2004). Se cree que las primeras garrapatas tenían una biología de “tipo argásida”: alimentación rápida (demasiado rápida para una lisis eficiente de glóbulos rojos), lotes pequeños de huevos y múltiples etapas ninfales; de hecho, tanto los argásidos actuales como *N. namaqua* no lisan de forma inmediata los glóbulos rojos, lo que les permite mantenerse durante meses después de la ingesta mediante una digestión lenta (Mans y col. 2012). Esta es una buena estrategia en entornos donde los hospedadores son escasos y las garrapatas necesitan sobrevivir durante meses o años sin alimentarse. Por tanto, los ancestros

presentaban características de los ixódidos actuales, como un escudo de protección, alimentación prolongada, secreción de cemento y excreción de agua a través de las glándulas salivales (Mans y col. 2016). De esta forma, la contribución de especies como *N. namaqua* es fundamental para la reconstrucción de la evolución de las garrapatas desde sus orígenes hasta nuestros días (Mans y Neitz 2004), aunque aún se necesitan más estudios que ayuden a su comprensión.

2.1.2. Características de la Morfología Externa de los Ixódidos

Las garrapatas destacan entre los ácaros por su tamaño, considerablemente mayor que los demás representantes del grupo (entre 2 y 20 mm de longitud). El cuerpo, sin alimentar, es aplanado dorso-ventralmente, con un contorno más o menos oval y dividido externamente en tres regiones: idiosoma, capítulo y patas.

En la superficie dorsal del **idiosoma** de los ixódidos hay un escudo que protege a la garrapata (caracter diferencial con los argásidos); se localiza en la región anterior en hembras y estadios inmaduros, pero cubre todo el cuerpo en los machos. El **escudo** puede ser rugoso, punteado o cubierto con setas y/o sensilas, según un patrón específico. Los ixódidos pueden presentar en los márgenes laterales del escudo **ojos** simples, aunque no todos los géneros (Estrada-Peña y col. 2004a). Posteriormente al escudo (*alloscutum*), en hembras y estadios inmaduros hay una parte no esclerotizada que se expande durante la alimentación (en machos la expansión es menor porque el escudo cubre toda la superficie dorsal); es una parte caracterizada por estriaciones finas que representan los pliegues superficiales, con poros y sensilas; en el borde posterior puede presentar **festones** (el festón central se denomina *parma* si está desarrollado de forma distintiva) (Sonenshine y Roe 2014). En la parte ventral del idiosoma de los adultos se localiza el **poro genital** en la línea media, a nivel de los primeros pares de patas; en los machos está cubierto por una placa móvil que puede elevarse durante la copula, en las hembras aparece como un surco en forma de U o V en dirección posterior con pliegues marginales prominentes. En la misma línea, en la región posterior se encuentra el **poro anal**, con un surco que puede estar rodeado de **placas adanales** (uno de los caracteres morfológicos diferenciales en los machos) y un par de **estigmas respiratorios** en los laterales (ausentes en el estadio larval), posteriores a la cuarta coxa (Sonenshine y Roe 2014) (Fig. 2.5).

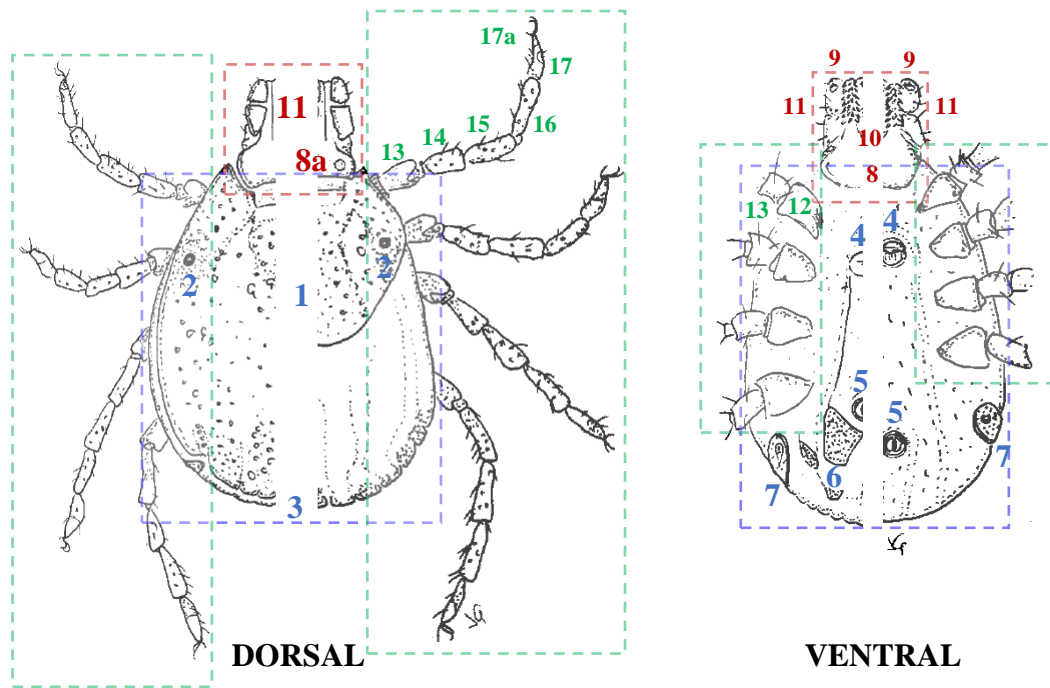


Fig. 2.5. Dibujos originales de la anatomía externa de los adultos ixódidos basados en los bocetos de Estrada-Peña y colaboradores (2014a). Se muestra separada la morfología del macho (izq.) y la hembra (dcha.) Se presentan diferenciadas por colores las tres regiones principales: idiosoma (azul), capítulo (rojo) y patas (verde). (1) Escudo. (2) Ojos. (3) Festones. (4) Poro genital. (5) Poro anal. (6) Placas adanales; sólo en machos. (7) Estigmas respiratorios. (8) Base del capítulo; (8a) placas porosas sólo visibles en hembras. (9) Quelíceros. (10) Hipostoma. (11) Palpos. (12) Coxa. (13) Trocánter. (14) Fémur. (15) Genua o rodilla. (16) Tibia. (17) Tarso; (17a) órgano de Haller, presente sólo en el primer par de patas.

El **capítulo**, gnatosoma o aparato bucal está formado por una **base** que sirve de anclaje para las demás estructuras (Fig. 2.5): los quelíceros, el hipostoma y los palpos. Los **quelíceros** tienen tres artejos; el proximal es cilíndrico, con una base mazuda profundamente introducida en el cuerpo de la garrapata, y sobre él se asientan los otros dos artejos, provistos de dentículos en su borde, que forman una pinza (Gil-Collado 1961); tienen función perforadora, ya que cortan la piel del hospedador durante la alimentación, moviéndose de atrás a adelante (Wall y Shearer 2001). El **hipostoma** está rígidamente implantado en la base del capítulo y tiene forma mazuda, no se mueve, pero tiene varias series de dentículos, con valor taxonómico, dirigidos hacia atrás para fijarse a su hospedador. Entre el hipostoma y los quelíceros, se forma un hueco donde se abre la boca (Gil-Collado 1961). Los **palpos** están formados por cuatro artejos, como en la mayoría de los ácaros son órganos sensoriales que ayudan a la garrapata a encontrar a su hospedador (Wall y Shearer 2001), además, son rígidos y ahuecados en su cara interna para proteger a las otras piezas bucales (Gil-Collado 1961); entre ellos, el primero es muy corto,

como una pequeña prominencia globosa que se articula con la base del capítulo. La base del capítulo es una pieza única, cuya forma varía entre rectangular, hexagonal o subtriangular, siendo uno de los caracteres diferenciales más importantes para la identificación de garrapatas (Estrada-Peña y col. 2004a); en su borde posterior, puede presentar en la cara dorsal prominencias o **córnuas**, y en la cara ventral unos salientes o **aurículas** (Gil-Collado 1961). En las hembras, también hay un par de depresiones en la superficie dorsal de la base del capítulo, con numerosos microporos, denominadas **áreas porosas**, que cuentan con unas complejas glándulas secretoras con función desconocida aún; además, en las hembras, entre el escudo y la base del capítulo, está el órgano de Gené, una estructura extensible que produce una sustancia para proteger a los huevos de la desecación, y que solo se hace visible en la oviposición (Sonenshine y Roe 2014).

Los ixódidos tienen cuatro pares de **patas** en sus estadíos adultos y ninfales, pero sólo tres en el estadio larval. Cada pata consta de 6 artejos: **coxa**, **trocánter**, **fémur** (en ocasiones dividido en dos), **genua** o rodilla, **tibia** y **tarso** (Fig. 2.5); todos se unen por articulaciones circulares. Las coxas se insertan en la superficie ventral del cuerpo y pueden rotar antero-posterior y dorsoventralmente; el resto de artejos pueden moverse sólo en un plano (Sonenshine y Roe 2014). Los trocánteres son cortos, los fémures y las tibias más bien alargadas y robustas (Gil-Collado 1961). En la superficie dorsal del tarso del primer par de patas se encuentra el **órgano de Haller**, fundamental para la búsqueda del hospedador, la determinación de olores, el reconocimiento de feromonas y otras funciones sensoriales importantes; cada pata finaliza con un **garfio o uña** y una estructura a modo de lengüeta, el **pulvilo** o ambulacro adhesivo, que facilita el desplazamiento en superficies suaves (Sonenshine y Roe 2014).

2.1.3. Ciclos Biológicos

El ciclo vital de las garrapatas es el resultado de la adaptación a las condiciones ambientales y a la disponibilidad de hospedadores. La vida de un ixódido pasa por tres estadíos activos a partir de la eclosión del huevo: larva, ninfa y adulto. Cada estadío se alimenta una vez en su vida. El éxito de estos artrópodos radica en prolongar esa toma de sangre durante días e incluso semanas (Diehl y col. 1982); para ello, se fijan a un hospedador hasta saciarse y mudan al siguiente estadío o, en el caso de las hembras, eligen un sitio para hacer la puesta de huevos (suelen ser microambientes resguardados, como madrigueras, grietas o restos de hojarasca).

Dependiendo de si las larvas y ninfas mudan sobre el hospedador o fuera de él, se clasifican en: monofásicas, difásicas o trifásicas. Así, las garrapatas de un hospedador o monofásicas mudan dos veces en el mismo animal, como, por ejemplo, la garrapata del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. En las especies de dos hospedadores o difásicas, como *Hyalomma marginatum* o *Rhipicephalus bursa*, las larvas y las ninfas se alimentan sobre un hospedador, pero a diferencia de la larva, la ninfa alimentada se desprende para mudar en el suelo y buscar como adulto un segundo hospedador. No obstante, la mayoría de los ixódidos, entre ellos las especies *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum* o *I. ricinus*, tienen un ciclo de tres hospedadores o trifásico, de forma que cada estadio alimentado se desprende del hospedador para mudar, en el caso de los inmaduros, o realizar la puesta si se refiere a la hembra (Estrada-Peña y col. 2004a; Jongejan y Uilenberg 2004; Sonenshine 2009). Algunas especies son capaces de comportarse como monofásicas, difásicas o trifásicas, según las condiciones climáticas (fundamentalmente la temperatura) y la disponibilidad de la especie hospedadora (Apanaskevich y Oliver Jr 2014). Por ejemplo, *Hyalomma dromedarii*, puede tener ciclos de dos o tres hospedadores en verano, mientras que en primavera y otoño, cuando las temperaturas bajan, se desarrollan en un sólo hospedador (Apanaskevich y col. 2008a).

Además, según la afinidad de los distintos estadios por la misma u otra especie hospedadora, se habla de garrapatas monotrópicas, ditrópicas o tritrópicas. Entre las especies monotrópicas, se encuentran, por ejemplo, las garrapatas del conejo *Haemaphysalis hispanica*, *Rhipicephalus pusillus* e *Ixodes ventralloi* (Castellà 2002). Un ejemplo de especie ditrópica es *H. lusitanicum*, cuyos estadios inmaduros se alimentan sobre conejos y sus adultos sobre ungulados silvestres. Finalmente, cada estadio de las especies tritrópicas se alimenta de un animal distinto y, en ocasiones, son poco específicas (politrópicas o eurixenas), como *I. ricinus*, que parasita como larva o ninfa a roedores e insectívoros, aves e incluso reptiles, aunque las ninfas frecuentan animales de mayor tamaño; sus adultos parasitan preferentemente mamíferos de gran talla, como rumiantes, équidos o carnívoros. Algunas de estas especies tienen además afinidad por el ser humano (siendo antropofílicas), y son las que constituyen un mayor riesgo de salud pública (Márquez-Jiménez y col. 2005).

El ciclo biológico incluye ciertas etapas comunes, como: búsqueda del hospedador, alimentación y, según el estadio, cópula y oviposición (adultos), o muda (larvas y ninfas).

Búsqueda del hospedador

La supervivencia de una garrapata depende del hallazgo con un hospedador adecuado. Las estrategias que se despliegan para cumplir este objetivo son complejas y variables, adaptadas a las características de la especie. Desde esta perspectiva, las garrapatas se dividen en nidícolas o endófilas, si permanecen en la madriguera o el refugio del hospedador, y no-nidícolas o exófilas, cuando se encuentran en campo abierto (Sonenshine 2009). Sin embargo, hay que señalar que, en muchos casos, la línea que separa estos dos comportamientos es muy fina (Sobrino y col. 2012); incluso, es habitual que una garrapata adapte dicha condición según su estadio de desarrollo.

En las garrapatas/estadios endófilas/os, el contacto con el hospedador ocurre en el nido o madriguera, y raramente se encuentran fuera de dicho refugio. Este estrecho contacto favorece también la especificidad, siendo habitualmente monotrópicas (Gray y col. 2014), como *R. pusillus* e *I. ventralloi* que parasitan al conejo, o la garrapata del perro, *Rhipicephalus sanguineus*. Este grado de adaptación y estrecha convivencia tiene también sus limitaciones, ya que existe el riesgo de que los nidos o refugios sean abandonados durante el desarrollo vital de las garrapatas, un comportamiento que es habitual, por ejemplo, en el conejo silvestre, cuando el agua o el alimento escasean (Montoya y Mesón 2010a). Así, las garrapatas endófilas presentan una estrategia más pasiva, dependiente de la actividad del hospedador, dentro de un ambiente protegido, por lo que su mortalidad se produce en mayor medida por factores bióticos que por abióticos (Gray y col. 2014).

Aunque todas las garrapatas presentan un comportamiento de búsqueda y detección del hospedador mediante el llamado órgano de Haller, en las garrapatas exófilas es más dinámico, puesto que se encuentran en campo abierto. Pueden desarrollar dos estrategias, de emboscada, esperando a su hospedador, o cazadora, desplazándose activamente en su búsqueda (Anderson y Magnarelli 2008). En la estrategia de emboscada, las garrapatas trepan por la vegetación a diferentes alturas desplegando el primer par de patas para exponer sus órganos sensoriales (el órgano de Haller) y, cuando captan la presencia de un hospedador, se activan y aferran a él (Sonenshine 2009). En este caso, la temperatura y la humedad condicionan más la actividad de la garrapata y su ascenso/descenso a la vegetación para mantener el equilibrio hídrico (Randolph 2014). La altura a la que escalan depende del estadio y del tamaño del hospedador al que pretenden parasitar. Cada una parece ascender lo más alto posible, dentro de las

limitaciones de su tamaño, relacionadas con la tolerancia al estrés hídrico, la capacidad y los costes del movimiento, y las reservas de energía (Randolph 2014).

Las garrapatas que siguen una estrategia cazadora, salen de su micro-hábitat y se dirigen directamente hacia su hospedador cuando produce ciertos compuestos atrayentes (kairomonas) (Sonenshine 2009); especies como *Amblyomma variegatum*, *R. sanguineus* o *I. ricinus* responden al dióxido de carbono que exhalan los hospedadores (McMahon y Guerin 2002). Se ha descrito que los olores son el estímulo potencial más específico para las garrapatas, a pesar de que conllevan una limitación por la distancia y una direccionalidad por el aire (Waladde y Rice 1982); también existen otros estímulos importantes en la búsqueda, como la vibración, la visión, el contacto o el calor. Las condiciones ambientales también influyen en el comportamiento de búsqueda; por ejemplo, *I. ricinus*, sólo se mueve hacia el olor secretado por la piel cuando la humedad es suficiente (Randolph 2014). Desde un punto de vista ecológico, la ventaja de las especies exófilas de poder elegir entre un rango mayor de hospedadores en un espacio más abierto, se equilibra con la dificultad de estar sometidas a las inclemencias ambientales.

Como se ha mencionado anteriormente, hay especies que pueden comportarse como garrapatas endófilas y exófilas, según la estrategia del estadio. Por ejemplo, los estadios inmaduros de *H. lusitanicum* son endófilos porque generalmente se alimentan de animales que viven en madrigueras, pero sus adultos son exófilos, ya que parasitan grandes ungulados mostrando una estrategia activa y cazadora. Así como otras especies de este género, visualizan y persiguen a su hospedador a una velocidad sorprendente para su tamaño (Uspensky 2002).

Alimentación

La búsqueda del hospedador es el primer paso de una compleja serie de sucesos que engloban la alimentación de las garrapatas duras (Waladde y Rice 1982): (1) Búsqueda del hospedador; (2) Contacto con la piel; (3) Localización de la zona de alimentación; (4) Inserción del aparato bucal; (5) Fijación del aparato bucal (secreción de cemento); (6) Ingestión de fluidos (glándulas salivales); (7) Repleción; (8) Retracción del aparato bucal; (9) Desprendimiento del hospedador.

Una vez que la garrapata encuentra hospedador y toma contacto con su piel, busca una zona adecuada para alimentarse (Márquez y Guiguen 1992; Kiffner y col. 2011), normalmente son zonas de difícil acceso para el propio hospedador, pero también son condicionantes el grosor de la piel y la densidad de pelo. Elegida la zona, la garrapata articula el rostro hasta colocarlo casi perpendicular a la superficie de la piel, después realiza pequeños cortes con sus quelíceros, que posteriormente introduce junto con el hipostoma (Gil-Collado 1961). Los cortes producen una pequeña hemorragia o “charco” donde la garrapata se alimenta de la sangre extravasada (de forma telmófaga) (Lavoipierre 1965). Conforme el hipostoma se inserta, los palpos se mantienen fuera de la lesión, situándose a los lados, y una vez introducido el aparato bucal, la garrapata queda firmemente sujeta por los dentículos. En ese momento, excepto en algunas especies del género *Ixodes*, se produce la secreción del cemento que contribuye a la fijación de la garrapata. Hasta este momento se considera la fase preparatoria, que dura entre uno o dos días. Los primeros días los ixódidos no ingieren sangre, sino una mezcla lisada de células y tejidos, de hecho algunos estadios inmaduros pueden alimentarse eficazmente de linfa (Kemp y col. 1982). Después tiene lugar el proceso de la alimentación en dos fases, una lenta y gradual que ocurre en los siguientes 4-8 días e incluye la cópula en los adultos, y otra final rápida de 24 horas donde la garrapata alcanza su peso máximo para continuar con el ciclo biológico (Hoogstraal 1985). Durante esa ingestión, aunque se induce una respuesta inmune del hospedador, la garrapata es capaz de evadir ese sistema de defensa a través de ciertas moléculas de su saliva (anticoagulantes y otros compuestos activos) que permite prolongar la alimentación (Wikel 1999; Schoeler y Wikel 2001). Las larvas se alimentan durante 3-6 días, las ninfas de 3 a 10 días, y las hembras durante un periodo entre 6-12 días, según la especie. Una vez completada la toma de sangre (repleción), la garrapata retrae su aparato bucal y cae al suelo para comenzar un lento proceso de digestión. Al finalizar la alimentación, las glándulas salivares están totalmente degeneradas, siguiendo un proceso fisiológico secuencial regulado (Bowman y col. 2008).

Cópula

La hembra parcialmente alimentada permanece en el hospedador hasta ser fecundada por el macho (Diehl y col. 1982), dando lugar a la última fase de la alimentación. El periodo que puede esperar la hembra para la fecundación depende de la especie de garrapata, del hospedador, y otros factores, como el lugar de alimentación en el hospedador y su estado

inmune. Este encuentro de machos y hembras se facilita por la emisión de feromonas de agregación y reconocimiento sexual (Gothé 1987; Sonenshine 2006).

La cópula es un fenómeno lento, donde el macho se coloca en la cara ventral de la hembra y extrae con los quelíceros el espermatóforo (un saco que contiene los espermatozoides) para introducirlo en el poro genital de la hembra (Gil-Collado 1961). Sin embargo, se observa una diferencia en la cópula entre garrapatas *Metastrata* y *Prostrata* (género *Ixodes*). De forma que los machos *Metastrata* necesitan alimentarse antes de la cópula para promover la maduración del esperma (aunque consumen una cantidad de sangre mucho menor que las hembras, incrementando su peso sólo 1,5-2 veces) (Oliver Jr 1982); el apareamiento de estos machos siempre tiene lugar sobre el hospedador. Sin embargo, la mayoría de los machos *Prostrata*, no requieren la ingesta previa de sangre (sobreviven de las reservas acumuladas durante la alimentación como ninfas), por lo que la cópula puede tener lugar antes de la parasitación del hospedador (Apanaskevich y Oliver Jr 2014).

Oviposición

Para realizar una puesta numerosa, las hembras consumen grandes cantidades de sangre, incrementando hasta 100 veces su peso corporal. La puesta de varios miles de huevos, dependerá de la especie, los días de alimentación y el peso alcanzado (Diehl y col. 1982). El proceso de oviposición (Fig. 2.6) comienza con la articulación del capítulo y los palpos, que se doblan hacia la cara ventral, evaginándose el órgano de Gené para acceder a los huevos que emergen individualmente por el poro genital; el órgano de Gené arrastra el huevo hacia la zona dorsal, donde se deposita sobre el idiosoma. La oviposición de todos los huevos se realiza en una única puesta, agotando todas las reservas de la hembra que muere al finalizar el proceso.

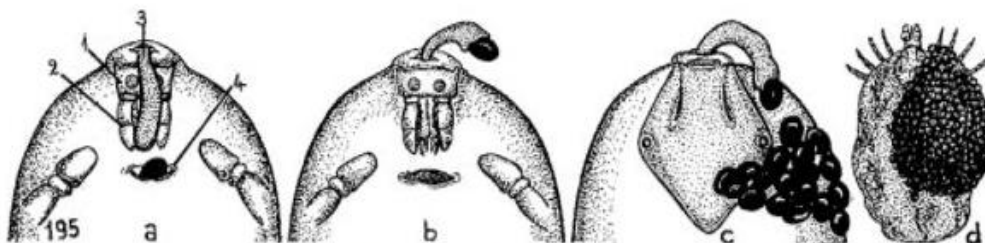


Fig. 2.6. Representación esquemática de la puesta de los huevos de una garrapata hembra (Gállego-Berenguer 2007). (a) El capítulo (1), los palpos (2), el órgano de Gené (3) y el poro genital (4). (b) El órgano de Gené arrastra el huevo. (c) Los huevos se van depositando sobre el idiosoma. (d) Representación de una hembra en estado avanzado de la oviposición, con su zona dorsal ocupada por cientos de huevos.

La masa de huevos está parcialmente protegida por el cuerpo de la hembra. Los huevos que quedan expuestos al exterior, posiblemente no se desarrollen, pero sirven como protección para el resto de la puesta (Gállego-Berenguer 2007).

Muda de los estadios inmaduros

Las larvas y las ninfas requieren también una alimentación de sangre para poder mudar al estadio siguiente (ninfa o adulto), un proceso que puede tardar varios días dependiendo de la época y la especie (Gállego-Berenguer 2007). La muda o ecdisis es un proceso controlado hormonalmente. Primero se produce la apolisis, donde la hipodermis secreta enzimas exuviales que digieren y ablandan parcialmente la endocutícula provocando que se desprenda y comience la formación de una nueva cutícula. Debido al aumento de la presión interna, la vieja cutícula se desgarra y el individuo emerge (Gállego-Berenguer 2007; Rees 2008).

Al igual que en la etapa de búsqueda del hospedador, el fotoperiodo puede actuar en las etapas de desarrollo, activando o retrasando la muda hasta que se den condiciones más favorables (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). Se ha establecido que las garrapatas tienen ciclos cuyas periodicidades están determinadas no sólo por los efectos directos del clima, sino también por mecanismos de regulación endógenos que siguen un ritmo circadiano, siendo el fotoperiodo fundamental para la sincronización (Belozerov 1982).

Duración del ciclo biológico

Las garrapatas tienen por sí mismas una gran capacidad adaptativa para sobrevivir, son los artrópodos que soportan los periodos más largos de inanición, pudiendo sobrevivir durante años en suelo con una tasa metabólica excepcionalmente baja (12% menos que un artrópodo normal) (Lighton y Fielden 1995). La principal adaptación para sobrevivir largos periodos es la diapausa; según Belozerov (1982) existen dos tipos: morfogenética y comportamental. La primera se refiere a un retraso en la metamorfosis de larvas y ninfas alimentadas, ovogénesis en hembras grávidas y embriogénesis en el huevo, y la segunda se describe como la suspensión de la estrategia de buscar hospedador en garrapatas sin alimentar. La ventaja de este comportamiento es sobrevivir en condiciones desfavorables, como bajas o altas temperaturas o en ausencia de hospedadores, permaneciendo inactivas (Apanaskevich y Oliver Jr 2014).

2.1.4. Factores que Influyen en el Ciclo Biológico

La dinámica de las garrapatas depende de una serie de factores abióticos (relacionados con el clima), que actúan principalmente en las etapas de vida libre de las garrapatas, y de los factores bióticos, relacionados con el hospedador (Randolph 2004).

Factores abióticos: Clima

Los principales factores abióticos que condicionan directamente una población de garrapatas son la temperatura y la humedad, que además tienen un efecto indirecto al condicionar a la vegetación y a los hospedadores. La temperatura regula el desarrollo de los estadios, mientras que la humedad relativa, junto con el déficit de saturación del aire, regulan las pérdidas de agua que pueden causar mortalidad (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). Los dos procesos claves en el ciclo de vida de cualquier especie de garrapata son la muda para los estadios inmaduros, la oviposición en el caso de las hembras, y los periodos de búsqueda de hospedador.

Aunque el umbral de tolerancia varía, en general, las bajas temperaturas del invierno ralentizan el ciclo biológico de las garrapatas, y su aumento progresivo favorece el desarrollo sincrónico de la muda que dará lugar a las garrapatas activas en vegetación durante la primavera (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). Por otro lado, la disponibilidad de humedad (la humedad del suelo, concretamente) es crítica para los huevos y las larvas (Uspensky 2002); en especies que habitan regiones semiáridas, la sincronización entre la oviposición y el inicio de la estación lluviosa es determinante para la supervivencia de los huevos y el desarrollo de las larvas (Knülle y Rudolph 1982).

Lógicamente, estos factores abióticos generales afectan más a las garrapatas exófilas, que permanecen en el medio en sus fases no parásitas y, por consiguiente, sufren más directamente las consecuencias climáticas. Uspensky (2002) relaciona la sensibilidad de las garrapatas al sistema de búsqueda de hospedador de emboscada o cazadora, siendo la tolerancia a la desecación mucho mayor en las garrapatas que se desplazan buscando activamente hospedador. El microclima en las capas de vegetación es el principal factor que puede condicionar su supervivencia, actividad y desarrollo (Randolph 2014; Estrada-Peña y de la Fuente 2014). La capacidad de adaptación a las condiciones ambientales es diferente en cada especie. En general, los grupos menos evolucionados, como los géneros *Haemaphysalis* y, especialmente, *Ixodes*,

soportan peor el déficit hídrico y se desarrollan mejor en ambientes muy húmedos (Hornok y Farkas 2009). Barandika y colaboradores (2011) observaron grandes diferencias entre dos regiones climáticas, el norte de España y la zona central, donde encontraron que *I. ricinus* y *Haemaphysalis punctata* preferían temperaturas suaves y condiciones húmedas, mientras que *H. lusitanicum* y *D. marginatus* se adaptaban mejor a las condiciones más secas. En climas fríos, la temperatura probablemente desempeña el papel más importante en la regulación de la fenología (junto con el fotoperiodo), mientras que en las regiones secas, es la disponibilidad del agua el factor clave (Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

Por el contrario, en las poblaciones de garrapatas endófilas, los factores abióticos están ligados a las condiciones del hábitat del hospedador. En este sentido, en el interior de las madrigueras se dan unas condiciones atenuadas de temperatura y humedad con respecto al ambiente exterior que no sólo son un refugio frente a sus depredadores, sino que también ayudan a sobrellevar las fluctuaciones ambientales, favoreciendo la supervivencia de las garrapatas (Gálvez-Bravo 2011). La organización y estructuración del micro-hábitat del refugio es clave: su profundidad, anchura de la entrada, naturaleza, tamaño, etc. (Gray y col. 2014). Por esta razón, y a falta de datos que lo confirmen, es posible que las especies endófilas sean más longevas.

Factores bióticos: Hospedadores

Además de la influencia del clima, hay dos parámetros que son esenciales en el ciclo de vida de las garrapatas, la composición y la abundancia de la comunidad de hospedadores. Hoy en día, los cambios producidos por la acción humana en la naturaleza han modificado la fauna, favoreciendo el aumento de poblaciones cinegéticas o de interés, y desatendiendo o reduciendo otras especies, alterando así el equilibrio ecológico (Carpio y col. 2014). La abundancia de algunos hospedadores condiciona la presencia y, en ciertos casos, la superpoblación de las garrapatas que los parasitan.

El método habitual de dispersión de las garrapatas es a través de sus hospedadores, por lo que el movimiento de sus poblaciones es un factor que condiciona la densidad de estos artrópodos en ciertas áreas. Estudios de campo han demostrado que las zonas de hábitat más frecuentadas por hospedadores están correlacionadas directamente con altas densidades de garrapatas, pero las zonas más alejadas tienden a tener poblaciones más pequeñas, incluso nulas, aunque las condiciones ambientales (climáticas) sean adecuadas; por tanto, la estructura espacial del

paisaje y su conectividad son clave para comprender la aparición de poblaciones locales de garrapatas (Estrada-Peña 2008).

Efecto del cambio climático

El controvertido cambio climático, como consecuencia de la huella ecológica, afecta también a las poblaciones de garrapatas, tanto por el incremento de la temperatura, como por los periodos de sequía o elevada pluviosidad (Field y col. 2014). Según las características del género y la especie de garrapata, el efecto del cambio climático puede ser diferente; en general, puede asumirse que las poblaciones de garrapatas podrían volverse más abundantes en zonas de mayor altitud, en respuesta al calentamiento global, lo que indudablemente tendría repercusión en la prevalencia de los patógenos transmitidos por ellas (Gilbert 2010; Dantas-Torres 2015). Además, tendría un efecto directo sobre los patrones de la actividad estacional (Belozero 1982); si el incremento de la temperatura fuera moderado, el desarrollo de los ciclos sería más rápido, aumentando su actividad, pero si la temperatura aumentara en mayor medida, la mortalidad aumentaría (Ogden y Lindsay 2016). Además del efecto directo de la temperatura, se experimentarían cambios por el efecto indirecto. Por ejemplo, el calentamiento del clima en Europa central podría dar lugar a una disminución del abeto rojo (*Picea abies*), que sería, posiblemente, sustituido por bosques de hayas (*Fagus sylvatica*), que constituyen un microclima favorable para la supervivencia de las garrapatas en la vegetación (Gray y col. 2009). De igual forma, el cambio afectaría a los animales del entorno, hospedadores potenciales de garrapatas.

Otro ejemplo del impacto del cambio climático sería el futuro escenario de la región mediterránea, donde el aumento de la temperatura y la disminución de las precipitaciones podrían favorecer la dispersión de *R. bursa*, *Rhipicephalus turanicus* y *H. marginatum* (Estrada-Peña y Venzal 2007). Es un hecho constatado que las condiciones climáticas de septiembre a diciembre limitan la población de *H. marginatum*, por lo que si las temperaturas ascendieran lo suficiente como para permitir la muda antes del invierno, los adultos podrían sobrevivir en áreas hasta entonces libres de esta especie (Gray y col. 2009). Por otra parte, la creciente sequía en determinadas zonas tendría un fuerte impacto en la estructura de la vegetación, haciéndola más abierta, favoreciendo las condiciones óptimas de las poblaciones de garrapatas exófilas, fundamentalmente de los géneros *Rhipicephalus* y *Hyalomma* (Gray y col. 2009).

2.1.5. Garrapatas del Ecosistema Mesomediterráneo

Rivas-Martínez (1987) describe el piso mesomediterráneo como el de mayor extensión territorial de la Península Ibérica, con una temperatura media anual de entre los 13 y 17°C. El autor explica cómo la distribución de las series de vegetación está condicionada por el sustrato y el ombroclima (precipitaciones), destacando los grupos de melojares y quejigares, alcornoques, encinares (carrascales) y coscojares, que se describen a continuación.

Las series de los melojares (*Quercus pyrenaica*) y quejigares (*Quercus faginea*), corresponden a bosques de hoja caduca, en muchos casos marcescentes, que se desarrollan en territorios en los que se registran elevadas precipitaciones estacionales. En las zonas aclaradas de sus bosques se suelen encontrar arbustos, como el madroño (*Arbutus unedo*), el durillo (*Viburnum tinus*), o el labiérnago (*Phillyrea latifolia*). Las series del alcornoque (*Quercus suber*) corresponden a bosques esclerófilos, desarrollados sobre suelos silíceos profundos en territorios húmedos; los arbustos y plantas herbáceas que acompañan a estas series dependen del grado de degradación del terreno, e incluyen desde leguminosas, cistáceas (jarales), ericáceas (brezales), labiadas (lavanda, tomillo o romero), así como otras especies (lentisco, mirtos, aladierno, etc.). Las series de la encina carrasca (*Quercus rotundifolia*) corresponden a un bosque denso de encinas que en ocasiones puede albergar otros árboles (enebros, quejigos, alcornoques, etc.) y que posee un sotobosque arbustivo en general no muy denso. Estos árboles y arbustos son buenos bioindicadores del límite superior del piso mesomediterráneo, ya que tienden a desaparecer más al norte por las bajas temperaturas; otro ejemplo son los árboles cultivados, cuando las condiciones del suelo aún son favorables. Las formaciones de altas gramíneas (espartales, berceales, ballicares, etc.) pueden ocupar grandes extensiones de terreno que son susceptibles de diversos aprovechamientos, como la ganadería extensiva o la obtención de fibras, entre otras. En cualquier caso, tales comunidades gramínicas son muy de destacar por su valor como conservadoras y creadoras de suelo. Finalmente, la serie de la coscoja (*Quercus coccifera*), corresponde a bosques densos en los que prosperan diversos espinos, sabinas, pinos y otros arbustos mediterráneos.

Este paisaje mesomediterráneo sirve de refugio y alimento a una fauna rica y variada, que incluye animales invertebrados y vertebrados, entre los que destacan especies amenazadas, como el lince (*Lynx pardinus*) y el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*), además de otras

especies representativas de interés ecológico y/o valor cinegético, como conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*), zorro (*Vulpes vulpes*), ciervo (*Cervus elaphus*) y jabalí (*Sus scrofa*), entre otras (Fauna Ibérica 2018). A continuación, se describen las principales especies de garrapatas del ecosistema mesomediterráneo, y la parasitación de sus principales hospedadores, el conejo silvestre y el ciervo.

Principales especies de garrapatas

De las más de 800 especies de garrapatas descritas a nivel mundial, en España se han descrito 34, la gran mayoría pertenecientes a la familia Ixodidae, representada por cinco géneros: *Ixodes* (10 especies), *Haemaphysalis* (4 especies), *Dermacentor* (2 especies), *Rhipicephalus* (5 especies) y *Hyalomma* (4 especies); aunque también se encuentran otras especies incluidas en la familia Argasidae, del género *Argas* (5 especies) y *Ornithodoros* (4 especies) (Cordero del Campillo y col. 1994). Muchas de ellas se han adaptado a las condiciones del ecosistema mesomediterráneo, donde se encuentran el micro-hábitat y están presentes los hospedadores adecuados a sus necesidades. La riqueza faunística del ecosistema mesomediterráneo implica una gran diversidad de ixódidos parásitos de cada animal, sin embargo, las garrapatas más abundantes son las que parasitan especies de importancia ganadera o cinegética (Tabla 2.2).

Especie	Nº hosp.	Afinidad por los hosp.	Búsqueda del hosp.	Hospedadores principales
<i>Dermacentor marginatus</i>	3	ditrópica	endo/exoflica	I: roedores, lagomorfos, carnívoros. A: bovinos, ovinos, caprinos, équidos y suidos.
<i>Dermacentor reticulatus</i>	3	ditrópica	endo/exoflica	I: roedores, lagomorfos, insectívoros. A: perros, bóvidos, équidos y jabalíes.
<i>Haemaphysalis hispanica</i>	3	monotrópica	endoflica	Conejos
<i>Haemaphysalis punctata</i>	3	politrópica	exoflica	I: aves silvestres o reptiles. A: rumiantes domésticos y silvestres.
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	3	ditrópica	endo/exoflica	I: conejos principalmente, aves, etc. A: rumiantes domésticos, équidos, suidos domésticos, jabalí.
<i>Hyalomma marginatum</i>	2	ditrópica o monotrópica	endo/exoflica	I: pequeños mamíferos, aves y reptiles (a veces bóvidos). A: bóvidos, équidos, suidos y ocasionalmente carnívoros.
<i>Ixodes ricinus</i>	3	politrópica	exoflica	I: aves, reptiles, micromamíferos. A: mamíferos superiores.

Tabla 2.2. Principales garrapatas mesomediterráneas del ciervo y el conejo silvestre a partir de los datos de otros autores (Habelo y col. 2000; Estrada-Peña y col. 2004a). (Hosp.) Hospedador; (I) Inmaduros; (A) Adultos.

Especie	Nº hosp.	Afinidad por los hosp.	Búsqueda del hosp.	Hospedadores principales
<i>Ixodes ventralloi</i>	3	monotrópica	endofílica	Conejos principalmente, y otros como el gato, erizo, zorro.
<i>Rhipicephalus bursa</i>	2	monotrópica	exofílica	Artiodáctilos domésticos, silvestres y perisodáctilos
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	3	monotrópica	endofílica	Lagomorfos (conejos)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3	monotrópica	endo/exofílica	Perro y otros carnívoros

Tabla 2.2. (Continuación)

En este apartado se define el ciclo biológico de las garrapatas más frecuentemente encontradas en dos de las principales especies de interés cinegético, el ciervo y el conejo.

Entre las garrapatas del ciervo (Fig. 2.7) destacan, entre otras, *R. bursa*, una especie exófila, que completa su ciclo con dos hospedadores, y se alimenta principalmente en ovejas, caballos y ungulados silvestres, siendo monotrópica, aunque sus estadios inmaduros pueden parasitar también roedores y conejos (Estrada-Peña y col. 2004a). Posiblemente sea la especie más comúnmente detectada en las estepas peninsulares, llegando a alcanzar intensidades muy elevadas en los rumiantes domésticos (Encinas 2002). Los adultos se suelen fijar en la zona perineal e inguinal durante el periodo primavero-estival, y los inmaduros en cuello, espalda, dorso y cara medial de sus extremidades durante el otoño-invierno (Habela y col. 2000). Por otra parte, la especie *H. lusitanicum* es una garrapata trifásica y ditrópica, cuyos estadios inmaduros, de carácter endófilo, se alimentan de pequeños animales (principalmente conejos) desde abril a octubre, y sus adultos, de comportamiento exófilo, sobre ungulados silvestres durante el mismo periodo, con dos máximos de parasitación en primavera e inicio del otoño (Habela y col. 2000; Estrada-Peña y col. 2004a). Si bien *R. bursa* puede transmitir los agentes causales de la babesiosis y anaplasmosis al ganado, el interés de *H. lusitanicum* es ser, posiblemente, el principal vector de *Theileria annulata* en España (Viseras y col. 1999; Habela y col. 2000; Encinas 2002; De la Fuente y col. 2004), aunque también se asocia con otros agentes zoonóticos, como *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* (Toledo y col. 2009a, b; Varela-Castro y col. 2018) y el virus de la Fiebre Hemorrágica Crimea-Congo (ECDC 2016).

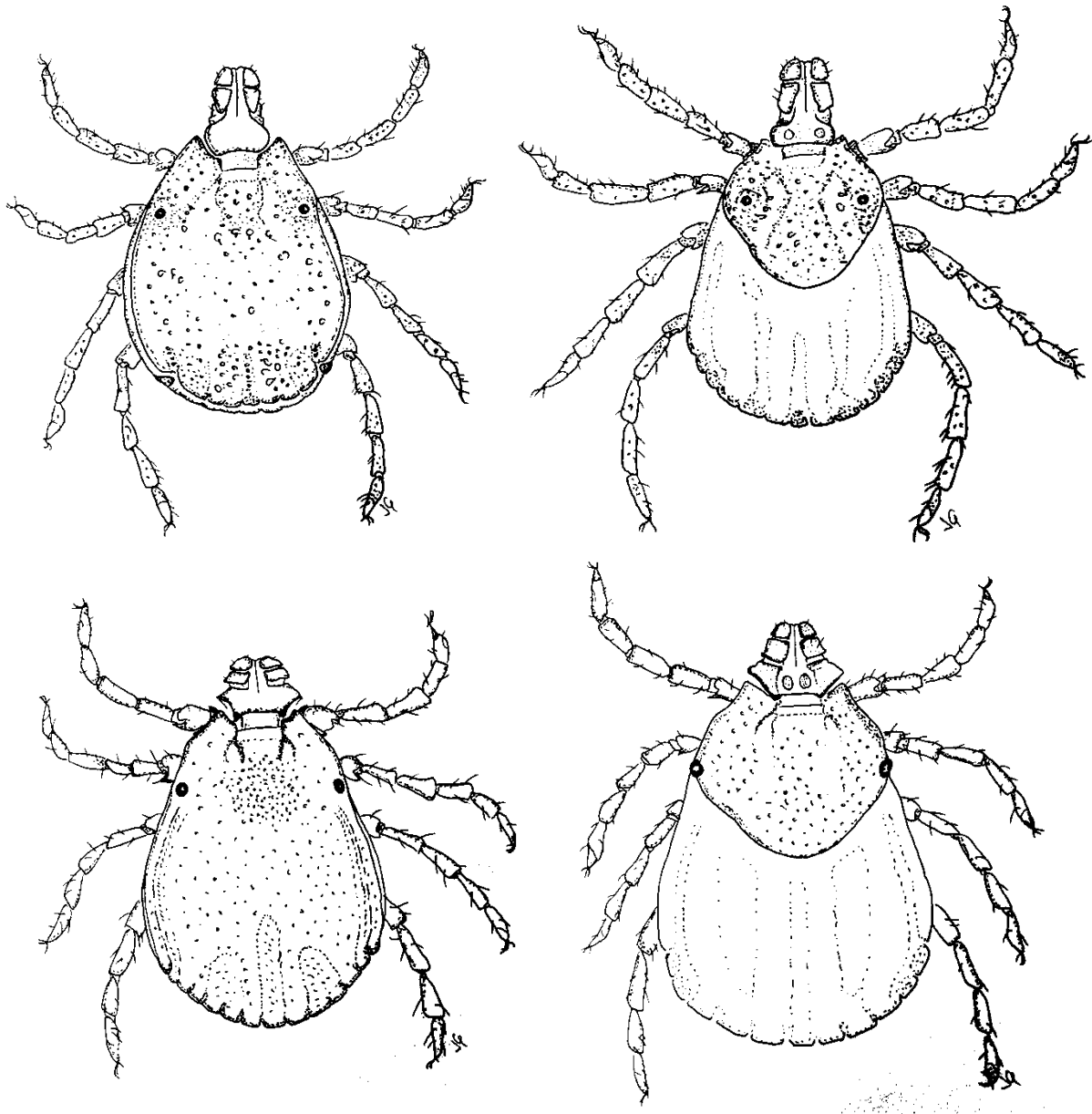


Fig. 2.7. Dibujos originales de la anatomía externa de los adultos de *Hyalomma lusitanicum* (arriba) y *Rhipicephalus bursa* (abajo) basado en los bocetos de Estrada-Peña y colaboradores (2014a).

Las principales garrapatas que se han descrito en el conejo son *Ha. hispanica*, *I. ventalloi* y *R. pusillus* (Fig. 2.8). *Ha. hispanica* es una especie con una distribución geográfica restringida prácticamente a la Península Ibérica, aunque también se la cita en algunas zonas del sur de Francia, se trata de una garrapata de ciclo trifásico, endofílica y monotrófica, pero poco se conoce sobre su biología (Hoogstraal y Morel 1970); la actividad de los adultos se centra en los meses de marzo y abril, la de las ninfas de agosto a septiembre y las larvas de mayo a julio (Márquez 1992; Castellà 2002). *I. ventalloi* es una especie más ubicua que parasita sobre todo a pequeños mamíferos silvestres, así como algunas aves y reptiles. Es una garrapata con ciclo

de tres hospedadores, endófila y monotrófica, bien adaptada a las zonas mediterráneas, secas, áridas y subhúmedas, aunque también se puede hallar en zonas más frías y húmedas (Castellà 2002). Las garrapatas adultas se encuentran sobre sus hospedadores en los meses de invierno, y suelen presentarse en escaso número; la presencia de larvas y ninfas es prácticamente continua a lo largo del año, pero con marcadas fluctuaciones (Márquez 1990). Finalmente, *R. pusillus* es

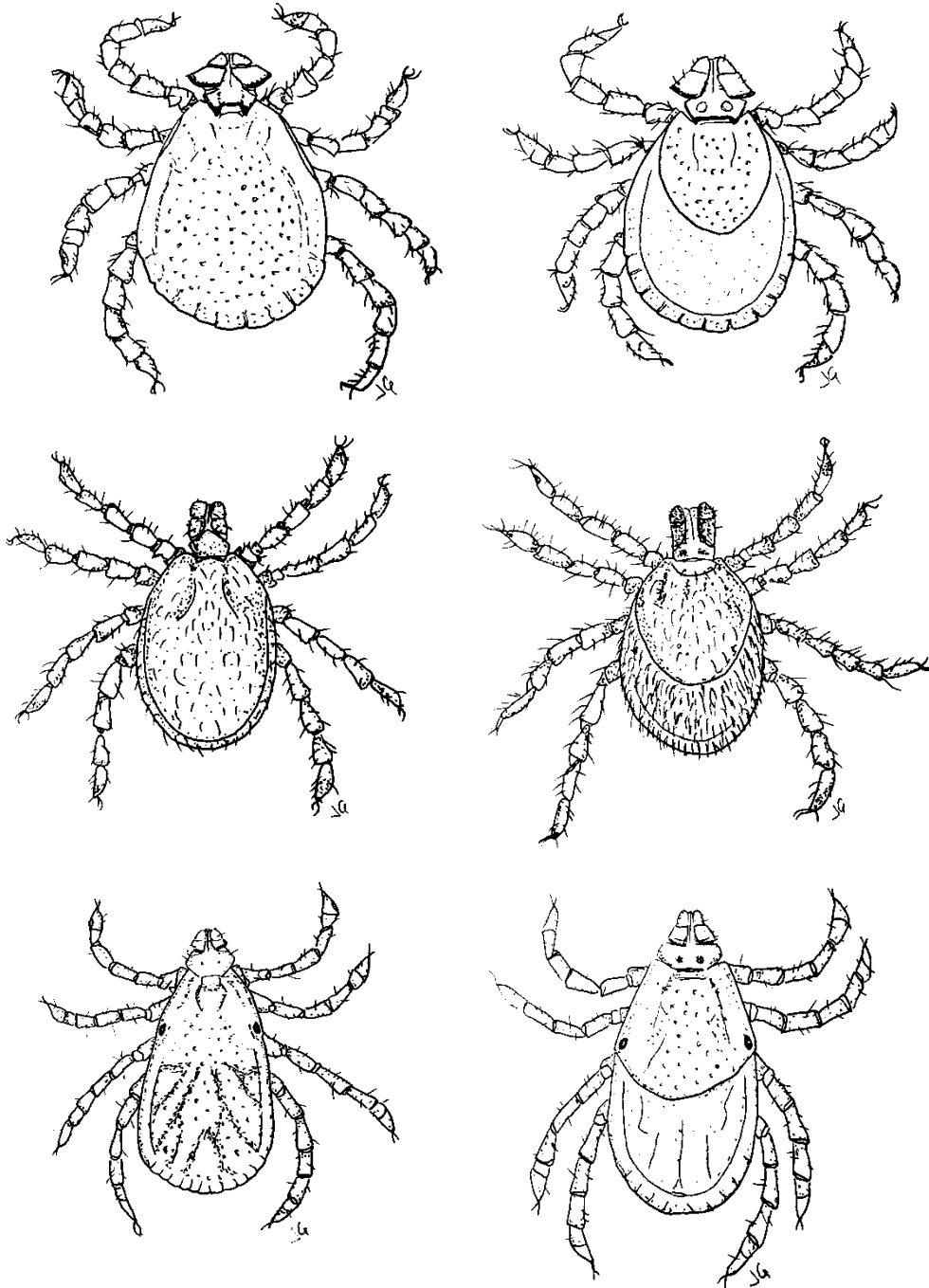


Fig. 2.8. Dibujos originales de la anatomía externa de los adultos (de arriba abajo): *Haemaphysalis hispanica*, *Ixodes ventralloi* y *Rhipicephalus pusillus*, basados en los bocetos de Gil-Collado (1948) y Hoogstraal y Morel (1970).

una garrapata de evolución trifásica, endófila y monotrópica, estrechamente relacionada con la vegetación mediterránea (Estrada-Peña y col. 1992). Aunque los principales hospedadores son los conejos silvestres, también se la puede hallar en una gran variedad de mamíferos silvestres y animales domésticos (Castellà 2002). Las larvas y las ninfas suelen aparecer sobre sus hospedadores de junio a septiembre, mientras que los adultos se pueden hallar en todos los meses del año, con mayor presencia primavera-estival (Márquez y Jiménez Millán 1988; Habela y col. 2000). En general, se desconoce si estas garrapatas desempeñan algún papel como vector de enfermedades del conejo u otros mamíferos silvestres (Castellà 2002).

Ciervo

Los ciervos españoles (*Cervus elaphus hispanicus*) son un grupo difícil de estudiar, dada la compleja relación entre sus patrones de abundancia, modelados por una historia de intervenciones humanas, la variabilidad regional o las interacciones ecológicas compartidas con otros organismos (Tellería 2010). Están mejor adaptados que otros cérvidos, como los corzos, para explotar hábitats muy manejados por el ser humano, como pastizales desarbolados o dehesas, por lo que se han visto menos amenazados (Tellería 2010). Además, tienen un valor cinegético mítico, por lo que siempre han sido objeto de gestión en muchas fincas mediterráneas, donde se concentran grandes poblaciones de esta especie. Durante los últimos siglos, las poblaciones de ciervos en la Península Ibérica se han localizado principalmente en la mitad suroccidental, coincidiendo con los hábitats ocupados por el bosque y matorral mediterráneo esclerófilo (Carranza 2017). De esta forma, su fragmentada distribución actual es el reflejo de las expansiones naturales y las reintroducciones cinegéticas.

En general, el ciervo es un animal moderadamente gregario, cuyos machos y hembras se mantienen en grupos separados durante la mayor parte del año, exceptuando la época de celo (Carranza 1986; Carranza y Valencia 1992). Sin embargo, el tipo de manejo de las fincas de caza afecta a la estructura de población de los ciervos, modificando el equilibrio entre sexos, favoreciendo la superpoblación, y sustituyendo la selección natural por la selección orientada al valor cinegético, entre otras (Carranza 2017).

Los parasitismos en las poblaciones de ciervos se ven afectados por las condiciones ambientales y características individuales de resistencia y condición física, por lo que varían anualmente (Carranza 2017). En el ciervo peninsular se han descrito parasitaciones por numerosas especies

de garrapatas (Hueli y Díaz-Sáez 1987; Cordero del Campillo y col. 1994; Estrada-Peña 1995; García-Romero y col. 2000; Ruiz-Fons y col. 2006), entre ellas *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Ha. punctata*, *Ha. hispanica*, *H. lusitanicum*, *H. marginatum*, *I. ricinus*, *R. (B.) annulatus*, *R. bursa* y *R. pusillus*, algunos de ellos vectores potenciales de patógenos (De la Fuente y col. 2004). En el centro y sur peninsular, las garrapatas más frecuentemente encontradas en ciervos son *R. bursa* y *H. lusitanicum* (Hueli y Díaz-Sáez 1987; Valcárcel y col. 1999; García-Romero y col. 2000).

Como se ha señalado, además del clima y la vegetación, la actividad del hospedador condiciona la dinámica poblacional de las garrapatas. Así, relacionado con los lugares de alimentación preferentes de los ciervos, los adultos, exófilos, se encuentran fundamentalmente en áreas de transición (ecotonos) entre zonas boscosas o cubiertas con vegetación arbustiva, y áreas abiertas donde exista producción de plantas herbáceas (Carranza 2017). Por otra parte, el ciervo se alimenta preferentemente durante la noche y en el crepúsculo, permaneciendo en reposo durante las horas centrales del día, encamado a la sombra (Carranza y col. 1991), donde las garrapatas se refugian bajo la hojarasca. La época de mayor disponibilidad de alimento es la primavera avanzada, en sincronía con la fenología reproductiva de las ciervas, de forma que el final de la gestación y principio de la lactancia tienen lugar en ese momento (Carranza 2017), cuando las garrapatas están más activas. Se han descrito, diferencias en la parasitación de los ciervos por garrapatas (Ruiz-Fons y col. 2013), siendo los machos más sensibles que las hembras, por factores intrínsecos, tales como la resistencia o condición física de cada individuo.

Conejo silvestre

El conejo está presente en la Península Ibérica (*Oryctolagus cuniculus*) desde hace, aproximadamente, 30.000 años, considerándose una especie autóctona; existen dos subespecies diferenciadas, según describen los estudios genéticos, una distribuida en el sudoeste peninsular (*O. c. algirus*) y otra en el nordeste (*O. c. cuniculus*), pero el área de contacto entre ambos linajes es relativamente estrecha y poco definida, con amplias zonas de cruzamiento (Montoya y Mesón 2010b).

La distribución y abundancia de las poblaciones de conejo dependen en gran medida de las condiciones climáticas (temperatura y precipitación) y de la disponibilidad de alimento y refugio (Gálvez-Bravo 2011). Por tanto, su hábitat ideal comprende lugares para cobertura y

refugio y sitios de alimentación, con densa vegetación, como matorrales y setos (Soriguer y Palacios 1994; Montoya y Mesón 2010c); así la mayoría de los datos ecológicos de la población del conejo en España proceden de estudios de Andalucía, en encinares y olivares principalmente, en el entorno de cultivos y monte mediterráneo (Soriguer 1981). En este tipo de ecosistemas el conejo es una especie muy bien adaptada y prolífica, capaz de ajustar su ciclo reproductivo a las características climáticas locales y a la disponibilidad de alimento (Montoya y Mesón 2010d).

El equilibrio natural entre presas y depredadores se altera fácilmente como consecuencia de las poblaciones de animales (Carpio y col. 2014). La situación del conejo silvestre en la Península Ibérica es un buen ejemplo de ello, ya que este animal no sólo es una especie de caza importante, sino que también desempeña un papel vital en la cadena trófica de más de 40 especies de depredadores (Soriguer 1980a; Delibes-Mateos y col. 2007). Debido a esta condición de eslabón elemental, un desequilibrio en su densidad podría causar un efecto perjudicial sobre el ecosistema (Virgós y col. 2007). Así, las poblaciones de lobos, lince y águilas, entre otras, están estrictamente ligadas a la abundancia de conejos, de forma que su disminución limita la densidad de estos depredadores especializados, lo que provoca, además, que otros depredadores oportunistas, como el jabalí o el zorro, incrementen sus poblaciones (Barreda Fontes y Martínez Guijarro 2009; Carpio y col. 2014).

Conscientes de su importancia ecológica y de valor cinegético, en Castilla-La Mancha se ha intentado replantear la gestión del conejo de monte, con el fin de obtener un equilibrio sostenible para el aprovechamiento de este recurso (Barreda y Martínez 2009; Ferreira 2012). En las fincas de caza administradas intensivamente se observa una mayor abundancia de conejos en comparación con otras áreas, debido a las medidas de gestión, fundamentalmente el control de depredadores y el manejo del hábitat (Delibes-Mateos y col. 2009).

El conejo de campo es hospedador de un elevado número de ectoparásitos, entre los que destacan las pulgas y garrapatas (Rodríguez y col. 1981). Las garrapatas del conejo presentan una marcada especificidad. El hecho de que el conejo sea un animal que vive en madrigueras, ha condicionado la co-adaptación de sus ectoparásitos hacia la endofilia y, por tanto, los ha limitado a unos nichos especializados, lo que justifica su especificidad (Castellà 2002). Incluso

se ha establecido un patrón de especificidad sobre la distribución espacial de la parasitación en el cuerpo del conejo (Márquez y Guiguen 1992).

La fenología de las garrapatas del conejo silvestre ha sido estudiada en distintas localizaciones, nacionales e internacionales (Soriguer 1980b; Rodríguez y col. 1981; Gilot y col. 1985; Márquez 1993). Estos estudios definen la ixodifauna del conejo silvestre con tres especies principales: *Ha. hispanica*, *I. ventalloi* y *R. pusillus* (Castellà 2002). Sin embargo, el conejo puede ser también hospedador de fases larvarias y ninfales de otras especies de garrapatas que, para completar su ciclo biológico, precisan de otros hospedadores de mayor tamaño, como ocurre con *H. lusitanicum* o *D. marginatus* (Rodríguez y col. 1981).

Las garrapatas son hemoparásitos complejos, perfectamente adaptados morfológica y fisiológicamente a sus hospedadores y el entorno, debido a su antiguo origen y evolución milenaria. En la Península Ibérica, y en concreto en el ecosistema mesomediterráneo, predominan las especies parásitas de animales de valor cinegético y ecológico, como el ciervo y el conejo. La complejidad de su ciclo requiere métodos de estudio diseñados para cada especie y en función de las características del hábitat. A continuación, se detallan los principales métodos.

2.2. Métodos de Estudio

2.2.1. Recogida de Garrapatas en Vegetación y Animales

La fenología de las garrapatas depende tanto del microclima (el clima de las capas inferiores de la vegetación o del refugio de un hospedador) como de la abundancia y disponibilidad de hospedadores, determinando su estacionalidad y actividad durante el año (Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

La abundancia de garrapatas en la vegetación da una idea de la actividad de búsqueda activa del hospedador y está condicionada por diversos factores ambientales y fisiológicos. Así, no se comportan igual las garrapatas endófilas que las exófilas, por lo que existen distintos métodos de muestreo para cada grupo, además, la efectividad de estas técnicas varía considerablemente según la especie de garrapata y el estadio a muestrear (Tälleklint-Eisen y Lane 2000; Vassallo y col. 2000). Para las garrapatas exófilas, su abundancia se determina con el método de arrastre o bandera (del inglés *dragging* o *flagging*) y la recogida de garrapatas caminando por visualización directa en un área determinada (Sonenshine 1993), como demostraron para *Amblyomma* Terassini y colaboradores (2010).

La técnica del arrastre consiste en pasar por el suelo una pieza de tela de felpa de 1 m² por detrás de la persona que realiza el muestreo, normalmente mediante una cuerda que va unida al eje basal de la tela, de forma que queda perpendicular a la dirección del movimiento; en cambio, la técnica de la bandera consiste en barrer una pieza de tela del mismo material unido a un mástil por la cubierta vegetal (Sonenshine 1993). El rendimiento de ambos métodos es muy parecido (Rulison y col. 2013), e incluso se usan indistintamente, ya que la eficacia depende de la retirada de las garrapatas adheridas al mismo material en intervalos variables. Sin embargo, Sonenshine (1993) sugiere que la bandera resulta más efectiva para muestrear zonas de sotobosque denso, puesto que puede forzarse al contacto con la vegetación, de difícil acceso con la técnica de arrastre, más adaptada a espacios abiertos. En cualquier caso, las limitaciones de estas técnicas son los factores climáticos adversos (viento, lluvia o nieve), y ciertas coberturas vegetales que pueden dificultar el arrastre y la recogida de ejemplares, así como la especie de garrapata en estudio (Dantas-Torres y col. 2013).

Se han desarrollado métodos de mejora de estas técnicas de muestreo, según la especie de garrapata a evaluar y las características de su zona de distribución. Gray y Lohan (1982), por ejemplo, determinaron que el mejor método para muestrear larvas de *I. ricinus* era una bandera (100 x 70 cm) cortada en diez tiras de 65 cm de largo, que permitían adaptarse mejor a la vegetación. Carroll y Schmidtman (1992) modificaron la técnica de la bandera, adaptando un mango (Fig. 2.9), para muestrear eficazmente vegetación en crecimiento y enmarañada, así como debajo de arbustos ornamentales y ramas bajas y caídas; era un método más práctico que reducía el esfuerzo del personal, ya que permitía permanecer de pie, sin inclinarse para mantener la bandera paralela al suelo, “barriendo” garrapatas (del inglés *tick sweep*); además, estos autores propusieron cambiar el material por tela de hule, resistente a las grietas y duradera en esa vegetación densa y espinosa.

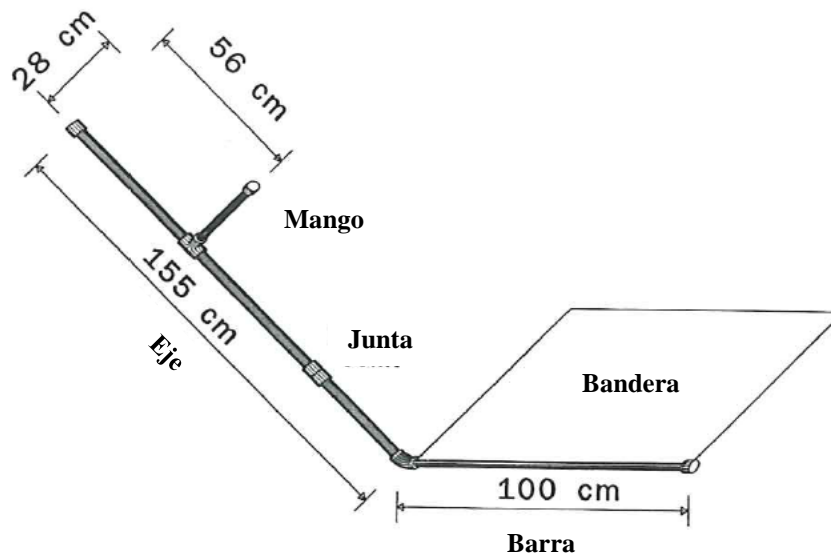


Fig. 2.9. Esquema de la modificación del método de arrastre o bandera descrita por Carroll y Schmidtman (1992).

Además de la atracción que supone el contacto de la tela con las garrapatas, simulando el paso de un hospedador, otros métodos utilizan también activadores y/o atrayentes, como kairomonas o trampas de feromonas (Carroll 2002; Sonenshine 2006). Las kairomonas son compuestos semioquímicos emitidos por el hospedador, como el CO₂, que ayudan a la garrapata a identificar y localizar al animal; por el contrario, las feromonas se utilizan para la comunicación intraespecífica de las garrapatas (Sonenshine 2004). Estas técnicas reducen el esfuerzo del muestreo, pero conllevan problemas logísticos, como la obtención de CO₂ en condiciones de campo, además de sus limitaciones de aplicación, y la producción de feromonas adecuadas para

cada especie. Ginsberg y Ewing (1989) compararon varios métodos de muestreo (Fig. 2.10) en distintas especies de garrapatas; así, comprobaron que la abundancia de los adultos de *Ixodes scapularis* fue la misma con la técnica de la bandera que por observación directa, sin embargo, los inmaduros, al buscar hospedador a ras del suelo, se recolectaban mejor con la bandera; por su parte, las trampas con hielo seco resultaron más eficaces para capturar *Amblyomma americanum*, incluso en áreas donde *I. scapularis* predominaba, lo que parecía consecuencia de la búsqueda más activa de *A. americanum*, o de la mayor atracción que el dióxido de carbono ejerce sobre esta especie. Las trampas con CO₂ son eficaces para recolectar ciertas especies de garrapatas, variando el resultado según su estadio (Falco y Fish 1992; Solberg y col. 1992), pero son ineficaces para otras, como *D. marginatus* (Gherman y col. 2012).

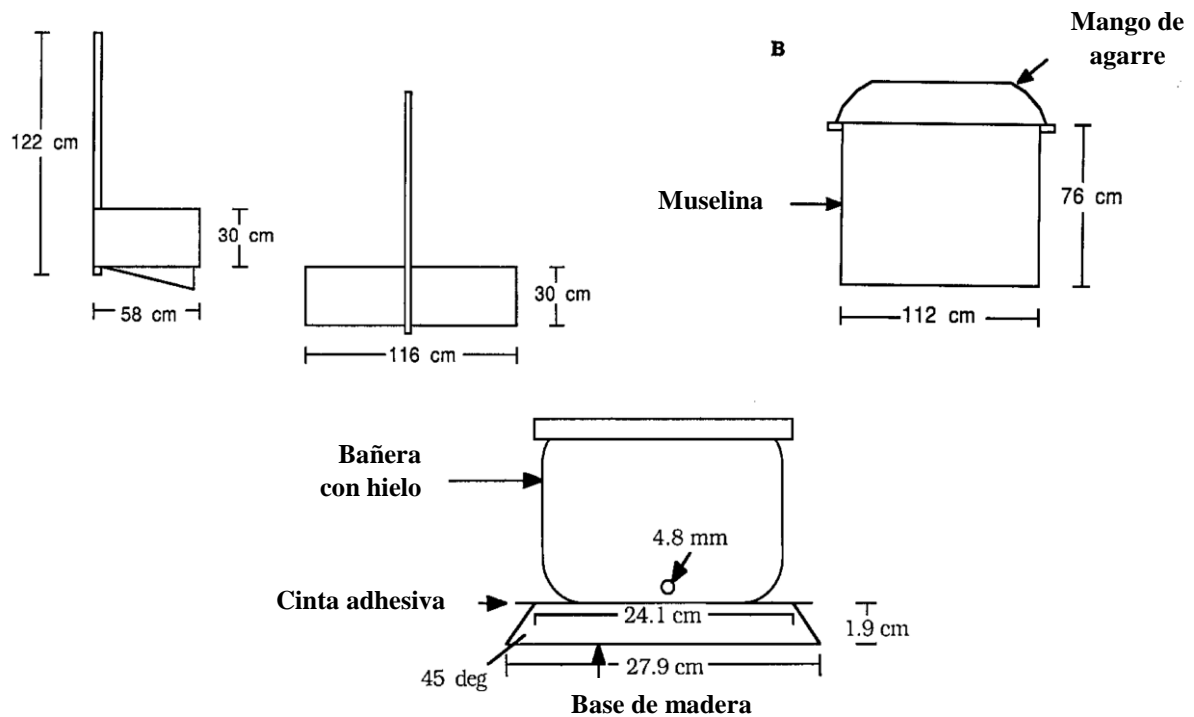


Fig. 2.10. Esquema de los métodos de muestreo utilizados en vegetación por Ginsberg y Ewing (1989). En la parte superior se muestran la técnica de la bandera (izquierda) y de arrastre (derecha); debajo una trampa de CO₂.

Además del dióxido de carbono emitido por la respiración de los animales, hay otros compuestos (kairomonas) en la piel del hospedador que pueden estimular la actividad de las garrapatas, como ciertas sustancias que se desprenden del pelaje de las glándulas tarsal, interdígital o preorbital del ciervo (Carroll y col. 1996). Fourie y colaboradores (1995) impregnaron las banderas con el extracto del hospedador para mejorar la eficacia del método

de muestreo. En la misma línea, se han utilizado feromonas, emitidas específicamente por la garrapata, como método de captura (Sonenshine 2006). Un ejemplo de ello es el estudio de Maranga y colaboradores (2003), que liberaron distintas dosis de feromonas de atracción-agregación-fijación a diferentes distancias de lotes de *Amblyomma variegatum*, consiguiendo una atracción del 90% cuando se combinó con una fuente de CO₂, mientras que el dióxido de carbono por sí mismo no resultó eficaz, y aplicando sólo las feromonas obtenían una buena respuesta, lenta y a menor escala. A pesar de la variedad de técnicas descritas, el método estandarizado para la recolección de garrapatas exófilas en vegetación es la técnica de arrastre o bandera, ya que a pesar de su limitada eficacia para ciertos estadíos y especies, permite estimar de forma objetiva la abundancia relativa de garrapatas.

Por el contrario, el método de elección para garrapatas endófilas es la recolección en sus refugios de forma manual o mediante sistemas de extracción al vacío (Fig. 2.11) (Butler 1991); aunque también pueden recogerse con la técnica Berlese, utilizando el material de los nidos o madrigueras (Barandika Iza 2012).

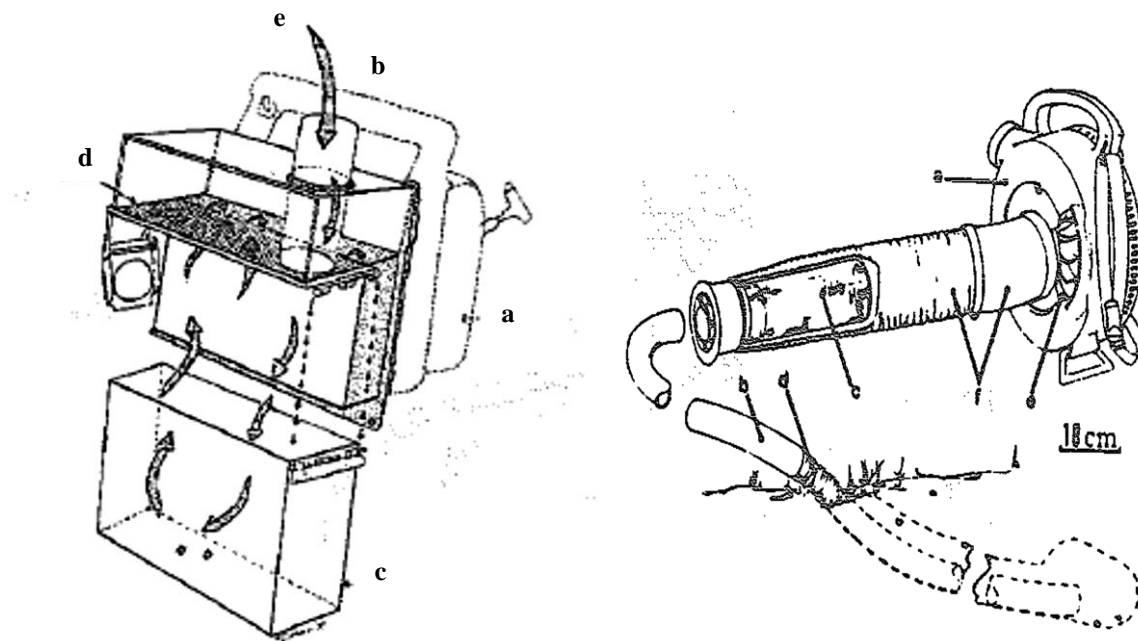


Fig. 2.11. Dispositivos de extracción al vacío (Butler 1991). A la izquierda, se muestra el sistema con (a) ventilador, (b) mangueras de 3-4 metros de largo por 2 cm, (c) caja extraíble de recolección (d) pantalla de separación de muestras y (e) flujo de aire. A la derecha otro dispositivo con (a) ventilador, (b) mangueras de 4 y 2 cm, (c) cesta de recogida, (d) madriguera de animales, (e) impulsores de metal y (f) carcasa de manguera.

Para completar el conocimiento de la fenología es necesario también recoger garrapatas directamente sobre los hospedadores. Sin embargo, hay dificultades para obtener resultados objetivos y estandarizar la técnica. En cada caso, deben tenerse en cuenta algunos aspectos, como el tamaño del hospedador y la piel a examinar, el tiempo disponible para la inspección (depende si el animal está vivo, anestesiado o muerto), el tamaño del estadio y la especie, y la experiencia de la persona que realiza el muestreo (Wilson 1994). Habitualmente se procede a la inspección detallada de todo el animal, o de una región corporal determinada. Como se ha indicado anteriormente, uno de los factores que puede influir en la eficacia de la técnica son las condiciones del hospedador, así, en animales domésticos es posible realizar la inspección directamente, mientras que en los silvestres es necesario recurrir a la sedación o debe procederse post-mortem. En este último caso, hay que tener en cuenta que las garrapatas tienden a desprenderse del cadáver cuando se enfría. Además, se pueden utilizar trampas para capturar animales vivos, habitualmente micromamíferos y carnívoros de tamaño medio, para su inspección tras la sedación (Moore y Gage 2004; Barandika Iza 2012). En cualquier caso, la retirada de las garrapatas debe realizarse con seguridad y cuidado, con unas pinzas desde el punto más próximo a la piel del animal, sujetando a la garrapata por el aparato bucal y ejerciendo una tracción perpendicular a la piel. La evaluación de la abundancia puede expresarse de forma cualitativa o cuantitativa, como la prevalencia de infestación (porcentaje de animales con una o más garrapatas) o la magnitud de la infestación (número de garrapatas por hospedador) (Wilson 1994).

2.2.2. Mantenimiento en Condiciones de Laboratorio y Alimentación Artificial

El mantenimiento en condiciones de laboratorio de una colonia de garrapatas permite el seguimiento de lotes de trabajo homogéneos, la adaptación a un entorno controlado y el registro de una serie de datos fisiológicos imprescindibles para su estudio.

Tradicionalmente se habían utilizado animales de experimentación, como ratas, cobayas, ovejas y conejos, en la alimentación de garrapatas (Rau 1965; Troughton y Levin 2007). Uno de los métodos más utilizados, consistía en adherir, normalmente en la espalda del animal, una pequeña caja o cápsula (método *pill box*) (Heyne y col. 1987). En el caso de la alimentación de garrapatas en conejo, la técnica más estandarizada es el uso de las bolsas de oreja (*ear bag*),

protegidas de los movimientos del conejo por un collar isabelino (Bailey 1960; Olmeda García 1992; Cota Guajardo 2015) (Fig. 2.12).



Fig. 2.12. Representación del material utilizado para alimentar garrapatas en el laboratorio sobre animales de experimentación. A la izquierda, la cápsula para el método *pill box* (Heyne y col. 1987). A la derecha, una bolsa de oreja y un collar isabelino para alimentar garrapatas en conejo (Olmeda García 1992).

La alimentación de garrapatas en animales de experimentación ha sido ampliamente utilizada en el pasado, ya que ha permitido el mantenimiento de colonias en condiciones de laboratorio y la obtención de valiosos datos sobre su fisiología. Entre las especies estudiadas destacan algunas mediterráneas, como *H. marginatum* (Knight y col. 1978), *H. lusitanicum* (Ouhelli y Pandey 1984) y *R. bursa* (Yeruham y col. 2000). Las condiciones ambientales controladas en las que se mantenían dichas colonias permitieron establecer la importancia de algunos factores en la supervivencia y desarrollo del ciclo. Así, exponiendo hembras de varias especies del género *Hyalomma* a distintas condiciones de temperatura y humedad relativa, se encontraron diferencias significativas en el tiempo de oviposición (Ouhelli y Pandey 1984; Ouhelli 1994).

Esta línea de investigación se ha visto obstaculizada cuando, por motivos éticos y logísticos, se limitó el uso de animales de experimentación (BOE 2013), siguiendo el principio de reemplazo, reducción y refinamiento. En este sentido, la alimentación artificial constituye una alternativa que, además, ofrece otras ventajas, como la estandarización de los resultados obtenidos y su mayor reproducibilidad. La alimentación *in vitro*, fue diseñada como una herramienta útil para testar productos acaricidas (Kuhnert 1996) o estudiar la transmisión de distintos agentes patógenos, como *Theileria mutans* (Voigt y col. 1993) o *T. parva* (Waladde y col. 1993, 1996). No obstante, la sustitución de animales por un método de alimentación artificial para garrapatas ha sido un proceso largo y difícil, que aún sigue en desarrollo.

Distintas membranas (piel natural, intestino animal, Parafilm® M, silicona, cubierta de colágeno, celulosa, etc.) dieron base al desarrollo de los sistemas artificiales de alimentación de artrópodos hematófagos. Aunque Totze (1933) hizo la primera referencia a una membrana artificial (hecha de celofán) para estudiar la respuesta de succión fisiológica de las garrapatas, no llegó a completar la alimentación. En los años 50 (Chabaud 1950) se consiguió la primera alimentación artificial mediante capilaridad, introduciendo las piezas bucales en un tubo (Fig. 2.13), una metodología ya utilizada en los años 30 para alimentar mosquitos y flebotomos (Mac

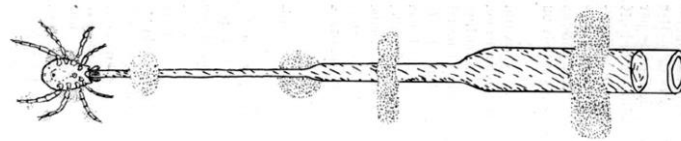


Fig. 2.13. Representación de la alimentación de garrapatas por capilaridad Chabaud (1950)

Gregor 1930, Fülleborn 1932, Hertig y Hertig 1927, citados por Chabaud 1950). Esta técnica, que utiliza hembras parcialmente alimentadas en su hospedador, sigue empleándose actualmente mediante distintos sistemas adaptados (Lew-Tabor y col. 2014; Ribeiro y col. 2014) (Fig. 2.14).



Fig. 2.14. Imagen del sistema de capilaridad adaptado con puntas de pipetas de plástico descrito por Ribeiro y colaboradores (2014).

La alimentación con membranas, utilizada previamente para alimentar chinches y mosquitos, era más complicada por el aparataje necesario para atemperar la sangre, hasta que Rutledge y colaboradores (1964) diseñaron un nuevo sistema ligado a un circuito de agua caliente para controlar la temperatura (Fig. 2.15); hicieron pruebas con membranas de intestino animal, piel de pollo, Parafilm® M y papel de plástico para alimentar mosquitos. Y casi simultáneamente, se iniciaba la alimentación de garrapatas blandas con sangre a 38 °C a través de membranas hechas de Parafilm® M, utilizando estimulantes como el glutatión (Galun y Kindler 1965).

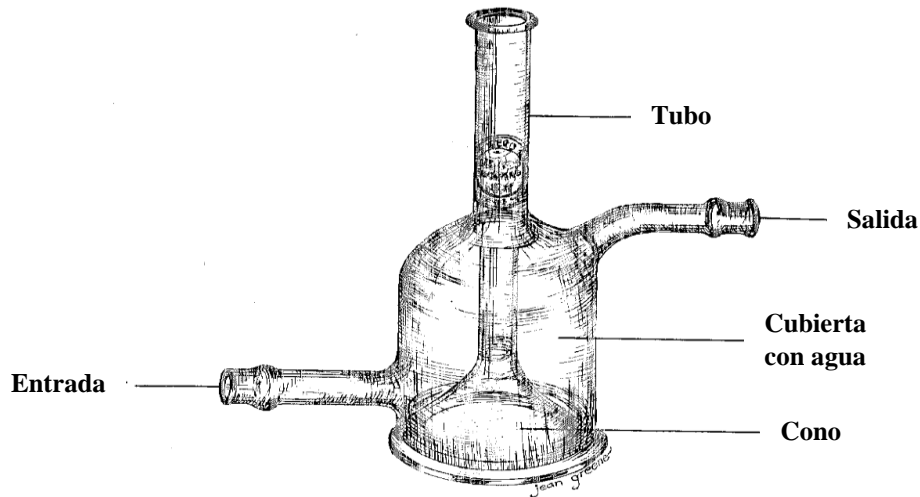


Fig. 2.15. Representación del sistema de alimentación diseñado por Rutledge y colaboradores (1964), con una entrada y salida para el circuito de agua caliente.

Se desarrollaron numerosas iniciativas para mejorar la alimentación artificial (sobre todo para la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) sobre distintas superficies, como huevos de pollo embrionados (Pierce y Pierce 1956), láminas de piel de ganado sobre papel Whatman en anillos de polimetilmetacrilato tapados con una gasa de Nylon (Kemp y col. 1975; Doube y Kemp 1979) (Fig. 2.16), o de intestino animal (Waladde y col. 1979), hasta llegar a la

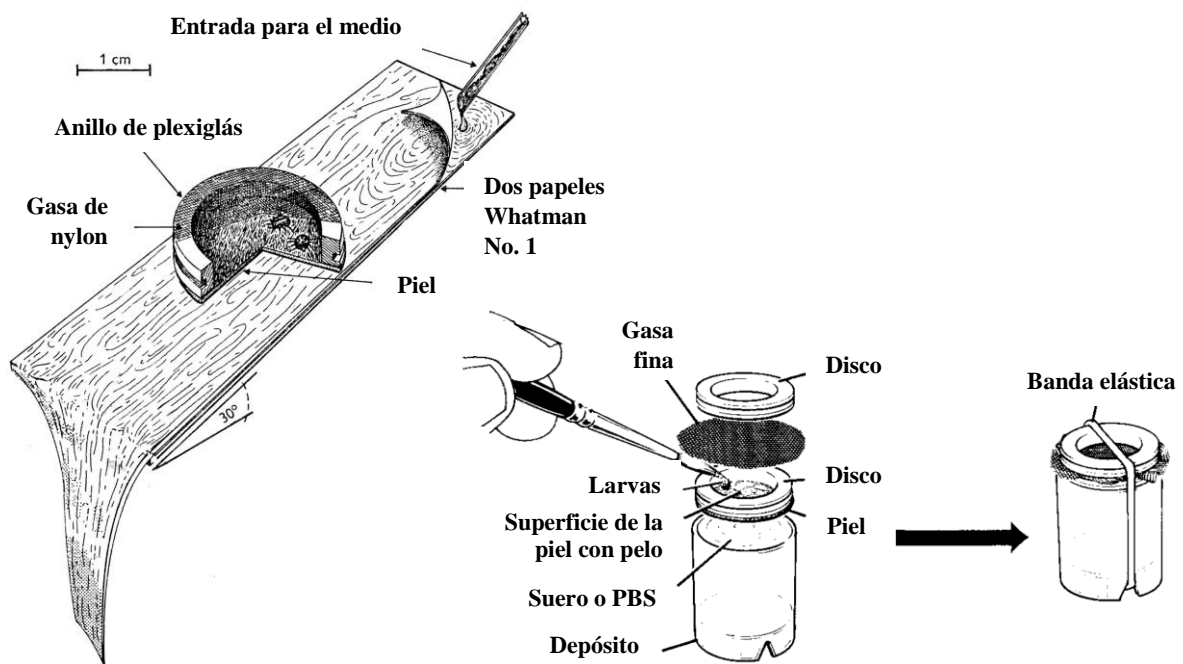


Fig. 2.16. Representación del sistema de alimentación sobre papel con láminas de piel de ganado y anillos de polimetilmetacrilato tapados con una gasa de Nylon (a la izquierda Kemp y col. 1975; a la derecha Doube y Kemp 1979).

membrana de silicona probada con éxito en moscas tse-tse, garrapatas Argasidae, Ixodidae y chinches, como *Rhodnius prolixus* (heteróptero triatomino) diseñada por Wetzel (1979).

Además de la búsqueda de una membrana artificial adecuada y el diseño de termostatos para mantener la temperatura constante necesaria, se probaron estímulos que impulsaran la alimentación, como el glutatión, antes citado como activador para los argásidos, el ATP, soluciones con NaCl, glucosa o sacarosa (Waladde y Rice 1982). De todos ellos, el ATP, una molécula fundamental que señala la rotura del tejido, fue uno de los estímulos clave para conseguir la formación de los conos de fijación de las garrapatas (cemento), lo que se consideró como el primer paso hacia una alimentación efectiva (Kemp y col. 1982).

En 1983, Stone y colaboradores utilizaron una nueva membrana hecha de silicona para alimentar *Ixodes holocyclus*, y consiguieron retener la toxina de parálisis secretada por la saliva, por lo que se confirmaba la eficacia de este sistema artificial. Ya en los años 90, comenzaron a completarse ciclos *in vitro* de garrapatas, como *Ornithodoros moubata*, a través de membranas de Parafilm® M (Schwan y col. 1991), y *Amblyomma hebraeum*, con membranas de silicona (Kuhnert y col. 1995). Kuhnert y colaboradores (1995) reforzaron la membrana empleada en los estadios inmaduros con una base de papel óptico y la de los adultos con una malla de Terylene (fibras de poliéster, de Tereftalato de Polietileno), y además estimularon la alimentación de cada estadio añadiendo a la membrana distintas combinaciones de pelo de hospedador, heces de garrapata, extracto de pelo bovino, y una mezcla de feromonas de agregación.

Sin embargo, a pesar de los avances, no se conseguía la repleción o ingesta máxima en las alimentaciones artificiales, hasta que Kröber y Guerin (2007a) modificaron la membrana de silicona desarrollada por Kuhnert y colaboradores (1995) para adaptarla al hipostoma de los adultos de *I. ricinus*. Esta membrana era también más flexible, lo que permitía a la garrapata retirar su aparato bucal y volver a prenderse en otro lugar, a medida que el sitio de penetración anterior se cerraba por las fuerzas elásticas de retracción de la membrana (Fig. 2.17). Además de los estímulos del hospedador, como restos de pelo y su extracto, ya utilizados anteriormente, añadieron factores mecánicos dentro de la unidad de alimentación, como un entramado que aumentaba los puntos de apoyo de las garrapatas (Fig. 2.17).

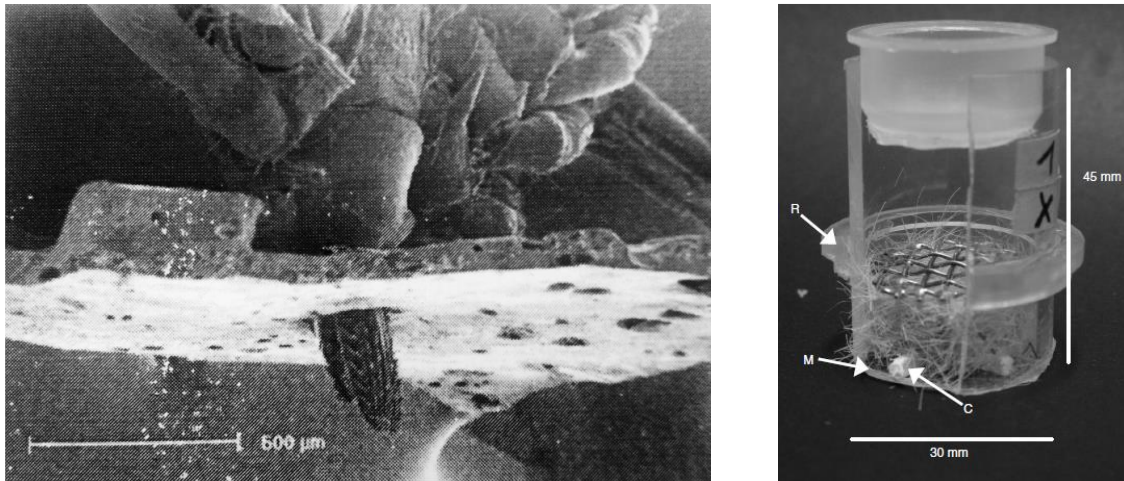


Fig. 2.17. Sistema de alimentación artificial desarrollado por Kröber y Guerin (2007a). A la izquierda, una hembra *Ixodes ricinus* anclándose en la membrana de silicona. A la derecha, una vista recortada de la unidad de alimentación: Parte de una cruz de plástico (C) colocada en la membrana (M), con el pelo de vaca sostenido por una rejilla de latón; el anillo (R) alrededor de la unidad asegura que haya 2 mm de sangre debajo de la membrana cuando se coloca en la placa de cultivo, y el tapón de plástico perforado de la parte superior cierra la unidad.

En el éxito de esta técnica han sido claves los estímulos y la composición de la sangre, ya que han permitido reproducir el micro-hábitat natural en una unidad artificial. Actualmente este tipo de membranas se han adaptado a otras especies, como *Hyalomma anatolicum anatolicum* y *H. dromedarii* (Tajeri y Razmi 2011), *R. sanguineus* (Fourie y col. 2013) *I. scapularis* (Andrade y col. 2014), y *D. reticulatus* (Krull y col. 2017).

No obstante, a pesar del éxito de la alimentación, el peso de las hembras que se obtienen y, por consiguiente, el tamaño de la puesta (Uspensky e Ioffe-Uspensky 1999), son inferiores a los observados por alimentación natural (Bonnet y Liu 2012). Otro inconveniente en la alimentación artificial es la contaminación de la sangre, que puede evitarse si se añaden productos antibióticos y anti-fúngicos (Bonnet y Liu 2012).

2.3. Control de Garrapatas

Como se ha visto en apartados anteriores, las garrapatas están ampliamente distribuidas por los distintos ecosistemas y parasitan a una gran variedad de hospedadores. En general, las poblaciones de garrapatas forman parte del entorno natural y participan en el mantenimiento del equilibrio de los mismos. Sin embargo, en determinadas circunstancias, la mayoría provocadas por la acción humana, las garrapatas constituyen un riesgo para la salud o un problema sanitario de los animales domésticos y/o silvestres. En estas circunstancias, es necesario establecer medidas de control. En el pasado se pensó que sería posible su erradicación (Pegram y col. 1996), si bien en la actualidad se considera que lo adecuado es mantener la población dentro de unos límites tolerables en equilibrio con el entorno. A pesar de ello, es una tarea compleja y difícil de alcanzar. Se ha combatido a las garrapatas desde la antigüedad, algunas de cuyas prácticas tradicionales siguen siendo utilizadas en nuestros días, coexistiendo con novedosos métodos de control; a continuación, se analizan las principales.

2.3.1. Prácticas Tradicionales

Sobre el hábitat

Dado que la mayoría de los ixódidos invierten la gran parte de su vida fuera del hospedador, la modificación de su micro-hábitat, condiciona su supervivencia. En este sentido se dirigen las prácticas tradicionales para el control de garrapatas. Entre ellas, la quema controlada de pastos, que sigue siendo empleada en la actualidad en algunas zonas. Esta práctica, enfocada a estimular la germinación de semillas y restablecer la sucesión, reduce también la abundancia de garrapatas que se ven directamente afectadas por el fuego inicial, o indirectamente por el efecto que la quema tiene sobre la vegetación y los hospedadores (White y Gaff 2018). Sin embargo, la eficacia de esta medida depende de la localización, el tipo de suelo, la especie de garrapata y el periodo de actuación (Drew y col. 1985). Así, se datan aplicaciones con éxito para el control de *I. scapularis* y *A. americanum*, aunque en todos los casos la reducción de la abundancia de estas garrapatas resultó ser temporal, volviendo a los niveles previos o incluso a densidades mayores en uno o dos años (Stafford y col. 1998; Cully 1999; Allan 2009).

Otra medida utilizada tradicionalmente es la modificación del entorno, como la siega de malas hierbas y pastos, que contribuye a reducir la humedad del suelo necesaria para la supervivencia

de las garrapatas, y elimina la hojarasca que sirve de refugio a los ixódidos (Clymer y col. 1970; Schulze y col. 1995). Su eficacia depende de los requerimientos fisiológicos de cada especie, ya que también hay garrapatas bien adaptadas a entornos más secos (Uspensky 2002). Son prácticas que pueden resultar eficaces pero necesitan de un mantenimiento regular (Wilson 1986; Mierzejewska y col. 2015; Bajer y col. 2017), además, la eliminación de la hojarasca puede afectar negativamente a otros artrópodos que dependen de dicho hábitat, incluidos muchos polinizadores (Ginsberg y col. 2017a).

Sobre los hospedadores

Tradicionalmente, también se han aplicado prácticas sobre el manejo de animales para reducir la abundancia de garrapatas, ya que la distribución y abundancia de las mismas depende, en gran medida, del movimiento y la densidad de los hospedadores (Wilson y col. 1985; Estrada-Peña y col. 2008a; Gilbert 2010; Kilpatrick y col. 2014). La eficacia de estas medidas depende del tipo de ciclo de la garrapata a controlar y su capacidad de supervivencia en el medio. Por ejemplo, la rotación de áreas de pastoreo es una medida aplicable a especies monofásicas/monotrópicas, como *R. (B.) microplus*, de forma que las garrapatas mueren de inanición ante la falta de hospedadores durante un tiempo prolongado (Hernández-A y col. 2000).

En especies no monotrópicas, que tienen afinidad por más de un hospedador, se pueden llevar a cabo acciones que reduzcan la densidad del hospedador principal o reservorio de un patógeno en el medio (Barandika y col. 2007; Ginsberg 2014). Entre las prácticas más habituales, destacan el control de la población y el acceso restringido a ciertas zonas. Estas medidas suelen aplicarse al ciervo, dada su importancia en el mantenimiento de ciertas especies de garrapatas en el medio (Gray 1998). Así, dentro de las estrategias desarrolladas para el control del brote de la enfermedad de Lyme en el nordeste de Estados Unidos, una de las medidas fue la reducción de la superpoblación de ciervos (Wilson y col. 1984; Jordan y col. 2007). En otras ocasiones, se ha limitado el acceso del ciervo mediante una barrera para el control de *I. scapularis*, *A. americanum* e *I. ricinus*, si bien su eficacia sólo puede ser analizada a largo plazo (Stafford 1993; Ginsberg y col. 2002; Kilpatrick y col. 2014). Los factores limitantes de esta medida son el tipo de explotación, la existencia de hospedadores secundarios o el efecto de la fragmentación de hábitat (Ginsberg 2014).

Un ejemplo de la actualidad de estas medidas, son las recomendaciones del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC 2018a) para prevenir la infestación por *I. scapularis*, y por ende, la transmisión de la enfermedad de Lyme, que aconsejan la eliminación de la vegetación que pueda atraer a los venados o la construcción de barreras físicas para evitar la entrada a jardines residenciales, entre otras (Fig. 2.18).



Fig. 2.18. Diagrama de prácticas tradicionales para el control de garrapatas basado en las recomendaciones descritas por el CDC (2018a). (1) Zona de garrapatas; (2) barrera de separación de la zona de riesgo; (3) guardar la leña lejos de la casa; (4) mantener una barrera de césped de seguridad para el jardín; (5) perímetro sin riesgo de garrapatas; (6) jardines con plantas que ofrezcan resistencia a los ciervos; (7) incluir el área recreativa dentro del perímetro sin riesgo.

2.3.2. Control Químico

El empleo excesivo de acaricidas y repelentes de garrapatas sigue siendo la estrategia más efectiva y práctica, a pesar de las limitaciones debidas al rápido desarrollo de resistencias y al impacto ambiental (Kunz y Kemp 1994).

La primera referencia relativa a la resistencia de una población de garrapatas a un acaricida, fue la consecuencia de la utilización indiscriminada de arsénico, durante más de 30 años, como solución frente a las infestaciones masivas de las garrapatas del ganado *R. (B.) microplus* entre 1890-1910 (Wharton 1983). El arsénico era económico, estable y soluble en agua, aunque tenía una actividad residual muy corta (menos de uno o dos días) (Drummond 1983), lo que obligaba a repetir tratamientos. Como consecuencia de la resistencia frente a los derivados del arsénico y sus residuos altamente tóxicos, se desarrollaron los primeros insecticidas orgánicos sintéticos, los organoclorados (dicloro difenil tricloroetano (DDT), hexacloruro de benceno (BHC),

lindano, dieldrina o toxafeno), ampliamente utilizados durante el siglo XX (George 2000); estos compuestos eran altamente efectivos frente a las garrapatas, de larga eficacia residual y fáciles de usar, pero la mayoría acumulaban residuos en el ambiente y los tejidos animales (Drummond 1983). Posteriormente en los años 60, los organoclorados se complementaron o reemplazaron con/por los organofosforados, como el cumafós y el diazinón, y derivados del carbamato, como el carbaril, ya que ofrecían la ventaja de ser biodegradables y metabolizarse rápidamente, aunque terminaban perdiendo su eficacia (Graf y col. 2004). En los años 70, debido a las resistencias generadas por los productos precedentes, se comenzaron a utilizar las formamidinas, como el amitraz (Wharton 1983). A partir de los años 80, proliferó la utilización de acaricidas con baja toxicidad en mamíferos, como las piretrinas y las lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas) (Sonenshine 2006), que al tener un origen natural serán tratadas en el apartado correspondiente a biopesticidas. Las piretrinas dieron lugar a los piretroides, análogos sintéticos obtenidos por sucesivas modificaciones isostéricas (Casida 1980), más estables y con menor efecto residual. Los piretroides se clasifican en productos de primera generación (aletrina), segunda (tetrametrina, resmetrina, bioresmetrina, biolaetrina y fonotrina), tercera generación (fenvalerato, permetrina) y a los actuales de cuarta generación, que incluye la cipermetrina y decametrina, entre otros (ATSDR 2018). A finales del siglo XX se comenzaron a utilizar reguladores de crecimiento de ácaros derivados de la benzoil-fenil-urea (el fluazurón, por ejemplo) (Graf y col. 2004), y otros acaricidas químicos, los fenilpirazoles, como el fipronil. La última incorporación al mercado de ectoparasiticidas para animales de compañía son las isoxazolininas (Shoop y col. 2014; Weber y Selzer 2016; McTier y col. 2016; Little 2017).

De forma global, la garrapata *R. (B.) microplus* es la principal plaga en ganado bovino doméstico en muchos países, por lo que la mayoría de los estudios sobre resistencia a acaricidas químicos se han desarrollado en esta especie. Para estudiar los mecanismos de resistencia, Abbas y colaboradores (2014) analizaron el mecanismo de acción de los principales grupos de acaricidas utilizados. En general, los principios activos actúan sobre el sistema nervioso de las garrapatas, si bien, mediante distintos mecanismos. Los organoclorados interfieren en el flujo de iones de las membranas de las células nerviosas, provocando una hiperexcitación que puede ocasionar la muerte; el DDT prolonga el tiempo de apertura de los canales de sodio, y el lindano y el toxafeno inhiben el flujo de cloro regulado por el ácido gamma amino butírico (GABA). Los organofosforados y los carbamatos, inhiben la acción de las colinesterasas

(irreversiblemente en el caso de los organofosforados), bloqueando la transmisión nerviosa de los ectoparásitos y provocando una parálisis. Las formamidinas se enfocan en la inhibición de la acción de la monoamino oxidasa (MAO) que metaboliza aminas neurotransmisoras de los ácaros y la estimulación de los sistemas octopaminérgicos, lo que provoca en ellos marcados cambios de comportamiento, y además, tiene un efecto repelente. Los piretroides, en general, penetran por contacto o ingestión en los ectoparásitos distribuyéndose rápidamente, despolarizando las membranas de las neuronas y produciendo parálisis. Tienen mayor estabilidad y potencia que los organofosforados y los carbamatos, y son seguros para los mamíferos, ya que se excretan rápidamente en forma de metabolitos de baja toxicidad, aunque pueden ser dañinos para los organismos acuáticos y, además, pueden desarrollar una resistencia cruzada al DDT, debida a su mecanismo de acción similar. Los reguladores de crecimiento derivados de la benzoil-fenil-urea actúan sobre la síntesis de la quitina y son inocuos para los mamíferos (Graf y col. 2004). Los fenilpirazoles inhiben el complejo GABA interfiriendo en la regulación nerviosa provocando una hiperexcitación que causa la muerte del artrópodo. Finalmente, las isoxazolininas actúan bloqueando los canales cloruro de los receptores GABA y glutamato, produciendo también un aumento de la estimulación nerviosa mortal para el parásito (Shoop y col. 2014; Weber y Selzer 2016; McTier y col. 2016; Little 2017). La aparición de resistencias se ha paliado, en parte, alternando productos con diferente mecanismo de acción, no obstante, continúa siendo un gran problema en amplios territorios de África y América (Mekonnen y col. 2002; Alonso-Díaz y col. 2006; Rodríguez-Vivas y col. 2018; Yessinou y col. 2018).

A pesar de las resistencias, muchos de estos grupos de acaricidas se siguen utilizando en la actualidad, y aunque se está reduciendo el uso de los organofosforados en Europa y Estados Unidos, productos como el cumafós se siguen empleando. A principios del siglo XXI, los piretroides representaban alrededor del 17% del mercado insecticida mundial (Guerrero y col. 2014). No obstante, el tipo de aplicación determina el producto a utilizar.

Sobre el hábitat

El esfuerzo y el gasto de tratar directamente grandes extensiones de tierra para el control de las garrapatas limitan el uso del control químico, sin embargo, algunos acaricidas pueden aplicarse a zonas restringidas, tales como establos, graneros y pastos pequeños (Drummond 1983). Se recomienda el tratamiento en senderos, perreras o áreas recreativas, pero no su uso general por

la potencial contaminación ambiental (Levin 2018) y el efecto nocivo sobre otros artrópodos beneficiosos.

La eficacia depende, no solo del producto elegido, sino también del método de administración. Los pesticidas pueden aplicarse al sustrato y la vegetación en forma de gránulos o pulverizadores a presión (Fig. 2.19). Una aplicación por aspersión a baja presión con un acaricida no persistente puede tener un fuerte efecto supresor inmediato pero un impacto muy limitado sobre la abundancia de garrapatas que buscan hospedadores dentro de unos días o semanas después de la aplicación; por el contrario, una aplicación a alta presión con un acaricida persistente maximiza la probabilidad de eficacia (Eisen y Dolan 2016). La formulación del producto también influye en su eficacia, así como la posibilidad de combinarlo con otras estrategias (Sonenshine y col. 2003). Otro factor a tener en cuenta son las condiciones climáticas en la zona a tratar, como la lluvia o la radiación solar, que podrían interferir en la concentración del producto o en las propiedades químicas del mismo.



Fig. 2.19. Aplicación de un producto químico sobre el hábitat con un sistema de presión como medida de control de garrapatas en una zona restringida.

Sobre los hospedadores

El sistema más ampliamente utilizado para el control de parasitación por garrapatas en los animales domésticos es la administración directa del producto. Los acaricidas pueden aplicarse por vía oral o tópica, a través de baños, pulverización, collares antiparasitarios, o la administración percutánea (*spot-on* y *pour-on*). La elección del tipo de administración depende de las posibilidades de manejo de los animales.

En animales silvestres, cuyo manejo es limitado o inexistente, hay que recurrir a métodos diseñados específicamente para cada hospedador y adaptado al entorno. En el caso del control de la infestación por garrapatas en ratones de campo, se utiliza el comportamiento de transporte de material para hacer el nido, proporcionándole cilindros de cartón biodegradable con algodón impregnado de permetrina en lugares estratégicos (Mather y col. 1987) (Fig. 2.20). También es posible aprovechar la concentración de animales en comederos y bebederos para aplicar los tratamientos. Por ejemplo, mediante rodillos tratados con acaricida y colocados a los lados de la tolva para que rocen la cabeza, las orejas y el cuello, lugares preferentes de parasitación por determinadas especies de garrapatas (Pound y col. 2000) (Fig. 2.20).



Fig. 2.20. Estrategias de control con acaricidas. A la izquierda, restos de algodón impregnado con permetrina para el control de garrapatas en ratones (University of Rhode Island 2018). A la derecha, el dispositivo de 4-postes colocados en un comedero para ciervos (Wong y col. 2018).

El impacto económico del control de ectoparásitos en animales domésticos, fundamentalmente de compañía, justifica el interés que ha demostrado la industria en mejorar los productos disponibles, por eficacia, seguridad, facilidad de aplicación y permanencia (Graf y col. 2004). Así, la industria de los animales de compañía es la más desarrollada, donde existen actualmente 23 productos comercializados para el control de garrapatas en perro y 7 para gato en el mercado español (ESCCAP España 2018); los principios activos que contienen pertenecen a seis grupos farmacológicos distintos: organofosforados, carbamatos, piretroides, fenilpirazoles, lactonas macrocíclicas e isoxazolininas. Algunos productos comerciales complementan su acción ixodicida con principios activos específicos para el control de insectos, como imidacloprid, metopreno, dinotefuran o piriproxifeno, entre otros (Tabla 2.3).

Nombre comercial	Especie animal	Principio activo	Grupo Acaricida	Vía de administración
Advantix*	Perro	Permetrina Imidacloprid	Piretroides Insecticidas	<i>Spot-on</i>
Bolfo	Perro Gato	Propoxur	Carbamatos	Collar/Pulverización
Bravecto	Perro Gato	Fluralaner	Isoxazolinás	Comprimidos
Broadline	Gato	Fipronilo (S)-metopreno	Fenilpirazoles Insecticidas	<i>Spot-on</i>
Comboline	Perro Gato	Fipronilo (S)-metopreno	Fenilpirazoles Insecticidas	<i>Spot-on</i>
Credelio	Perro	Lotilaner	Isoxazolinás	Comprimidos
Effitix	Perro	Fipronilo Permetrina	Fenilpirazoles Piretroides	<i>Spot-on</i>
Exspot	Perro	Permetrina	Piretroides	<i>Spot-on</i>
Frontline Combo	Perro Gato	Fipronilo (S)-metopreno	Fenilpirazoles Insecticidas	<i>Spot-on</i>
Frontline	Perro Gato	Fipronilo	Fenilpirazoles	<i>Spot-on</i> Pulverización
Frontline Tri- Act	Perro	Fipronilo Permetrina	Fenilpirazoles Piretroides	<i>Spot-on</i>
Kiltix	Perro	Propoxur Flumetrina	Carbamatos Piretroides	Collar
NexGard	Perro	Afoxolaner	Isoxazolinás	Comprimidos
NexGard Spectra	Perro	Afoxolaner Milbemicina oxima	Isoxazolinás Lactona macrocíclicas	Comprimidos
Prac-tic	Perro	Piriprol	Fenilpirazoles	<i>Spot-on</i>
Prevender	Perro	Diazinón	Organofosforados	Collar
Sarnacuran	Perro	Foxima	Organofosforados	Solución tópica
Seresto*	Perro	Flumetrina Imidacloprid	Piretroides Insecticidas	Collar
Simparica	Perro	Sarolaner	Isoxazolinás	Comprimidos
Scalibor	Perro	Deltametrina	Piretroides	Collar
Stronghold	Gato	Selamectina Sarolaner	Lactona macrocíclicas Isoxazolinás	<i>Spot-on</i>
Taberdog	Perro	Permetrina	Piretroides	Collar
Vectra 3D*	Perro	Dinotefuran Piriproxifeno Permetrina	Insecticidas Piretroides	<i>Spot-on</i>

Tabla 2.3. Listado de antiparasitarios externos disponibles para perro y gato en España (ESCCAP España 2018). (*) Productos con acción repelente además de ixodicida.

Finalmente, existen productos repelentes diseñados específicamente para la protección del ser humano (CDC 2018b) (Fig. 2.21). La medida más eficaz, además de otras recomendaciones prácticas para prevenir las picaduras (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2018), es la utilización de ropa protectora tratada con permetrina, DEET (N, N-dietil-m-toluamida) o IR3535, entre otros, si bien la eficacia de algunos ha sido discutida por distintos autores (Bissinger y Roe 2010; Cisak y col. 2012).



Fig. 2.21. Algunas recomendaciones para prevenir las picaduras de garrapatas: llevar ropa protectora tratada con repelentes o botas cerradas con calcetines que cubran la parte inferior de los pantalones (CDC 2018b; Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2018).

2.3.3. Control Biológico

La evolución de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas, además de otros problemas asociados, como la contaminación ambiental, ha sido un factor determinante para la investigación de métodos alternativos adecuados a los principios de la ecología sostenible. La Organización Internacional de Control Biológico (del inglés: *International Organization for Biological Control*), que promueve métodos de control de plagas y enfermedades seguros para el medio ambiente, define el control biológico como la utilización de organismos vivos o sus productos, para impedir o reducir las pérdidas o daños ocasionados por los organismos nocivos (IOBC 2018). Entre otros, el control biológico utiliza el efecto de los numerosos enemigos naturales de las garrapatas como depredadores, parasitoides, patógenos y biopesticidas.

Depredadores y parasitoides

Los depredadores naturales, como ciertas arañas, hormigas, roedores, lagartijas o aves, contribuyen a la reducción de garrapatas, por lo que sus poblaciones deberían preservarse dentro de ciertos niveles tolerables (Samish y Rehacek 1999). En referencia a los parasitoides, solo el

uso de avispas del género *Ixodiphagus* se ha descrito como medida de control. Es una avispa de pequeño tamaño que deposita sus huevos en la cavidad corporal de estadíos inmaduros y alimentados de garrapatas; tras la eclosión, las larvas se alimentan de los tejidos de la garrapata; la avispa emerge como adulto rasgando la cutícula de la garrapata que muere en el proceso (Mwangi y col. 1997). Es una estrategia poco desarrollada en la actualidad que, dadas las dificultades de su producción y los ambiguos resultados de los ensayos realizados hasta la fecha, requiere una investigación más amplia (Samish y col. 2004; Ginsberg 2014).

Hongos entomopatógenos

Los patógenos que infectan a las garrapatas incluyen una gran variedad de microorganismos como virus, bacterias, hongos y nematodos. En el control de garrapatas destacan los hongos entomopatógenos, componentes fundamentales de la microflora del suelo. En origen, son hongos necrotrofos, que degradan cadáveres de artrópodos por su capacidad para penetrar a través de la cutícula y crecer en tejidos muertos emergiendo al final los conidióforos, productores de esporas, esclerocios u otras estructuras reproductoras (Fig. 2.22) (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez 2008). Sin embargo, debido a la característica de algunas cepas

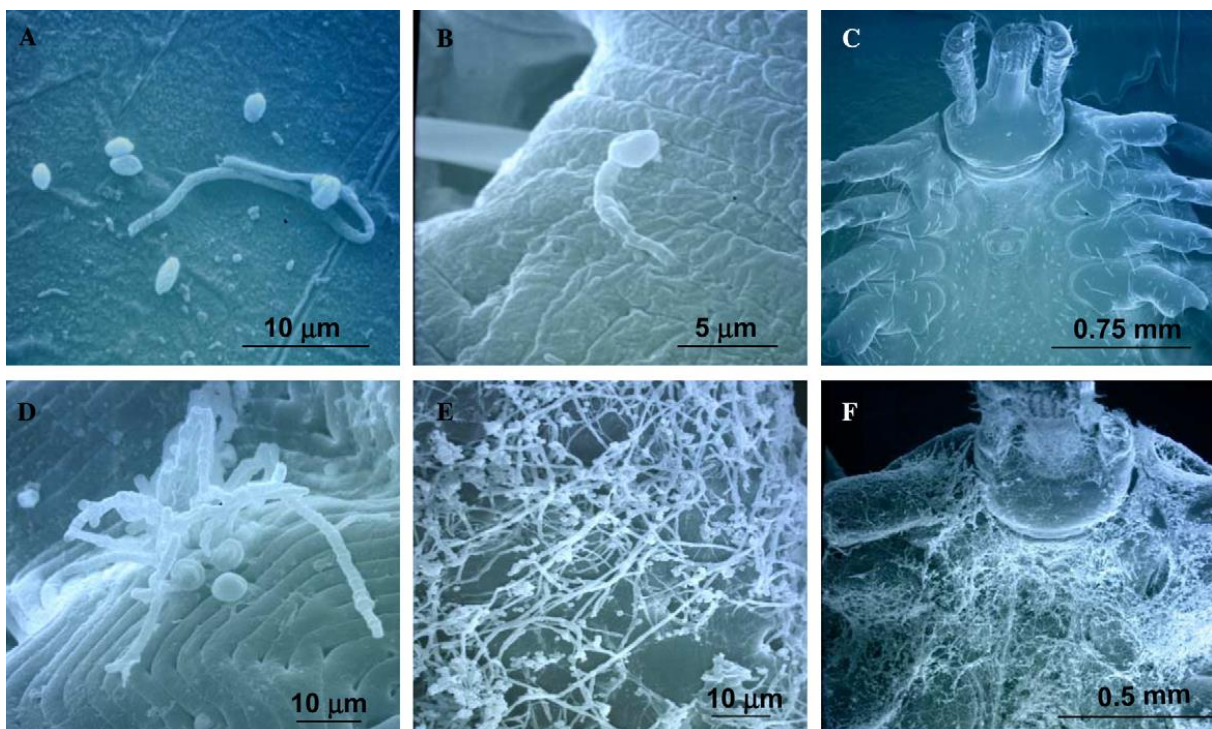


Fig. 2.22. Imágenes de microscopía electrónica representativas del proceso de infección mediado por los conidios de *Beauveria bassiana* (Kirkland y col. 2004). Conidios unidos a la cutícula de la garrapata *Amblyomma americanum* tras 24 horas (A), 7 días (B) y 14-21 días después de la infección (C); conidios unidos a la cutícula de *Amblyomma maculatum* 24 h (D), 7 días (E) y 14-21 días después de la infección (F).

para desarrollarse en artrópodos vivos, se han comercializado para el control de plagas vegetales (Fernández y col. 2005).

Las especies características del suelo de los ecosistemas naturales y cultivos de España son *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Quesada-Moraga y col. 2007). Los efectos nocivos de estos hongos sobre las garrapatas incluyen temblores y parálisis, así como alteraciones en el metabolismo de los perfiles lipídicos, la grasa corporal y el agua metabólica (Abdigoudarzi y col. 2009; Angelo y col. 2010a, 2013; Cradock y Needham 2011a). Los hongos entomopatógenos penetran a través del exoesqueleto y sus conidios son los responsables de la infección celular y humoral, pero la muerte del artrópodo puede ser resultado de distintas acciones, como la utilización de los nutrientes, la invasión física y la producción de toxinas (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez 2008).

La efectividad de esta medida de control varía, dependiendo no sólo de la especie de garrapata y la etapa de desarrollo (Kirkland y col. 2004), sino también de la especie y cepa fúngica. Se han realizado numerosos experimentos de laboratorio para analizar la virulencia de diversos aislados, principalmente de *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Fernandes y col. 2011; Perinotto y col. 2012; Cafarchia y col. 2015). Cepas de *B. bassiana* han sido efectivas en el control de hembras alimentadas de muchas especies de garrapatas como *R. (B.) microplus*, *H. anatolicum anatolicum*, y *Haemaphysalis qinghaiensis* (Barci y col. 2009; Sun y col. 2011; Ren y col. 2011, 2012; Sun y col. 2013). Asimismo, *M. anisopliae* ha demostrado tener un efecto ixodicida frente a adultos de *I. scapularis* (Zhioua y col. 1997), además de reducir la fecundidad de las hembras y la viabilidad de la puesta de *R. (B.) annulatus* y *R. sanguineus* (Gindin y col. 2002). Otras especies de hongos, como *Lecanicillium lecanii* y *Purpureocillium lilacinum*, preparados en suspensiones acuosas y oleosas, fueron eficaces frente a *Amblyomma cajennense* y *R. (B.) microplus* (Angelo y col. 2010b; D'Alessandro y col. 2012).

No obstante, incluso cuando se ha demostrado la eficacia de los hongos en condiciones de laboratorio, la efectividad del tratamiento en campo depende de las condiciones ambientales y los métodos de aplicación. Un estudio con adultos de *A. americanum* demostró la relación entre los resultados de la acción del hongo y las condiciones de humedad y temperatura (Cradock y Needham 2011a); la radiación ultravioleta y la acción directa de la temperatura afecta a la infección y al periodo de patencia; la humedad relativa es muy importante para la

conidiogénesis y, por consiguiente, para la transmisión horizontal del hongo (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez 2008); y, además, una mayor cobertura vegetal tiene un efecto negativo en la eficacia del hongo (Samish y col. 2014). Así, las condiciones ambientales son el principal inconveniente de su utilización en el control de plagas (Samish y Rehacek 1999), siendo, posiblemente, la causa de los diferentes resultados obtenidos en los distintos estudios realizados. En un ensayo donde se aplicó *B. bassiana* sobre vacas infestadas se observó una baja eficacia (18-32%) a las 72 horas de la pulverización (Campos y col. 2010). Sin embargo, en el trabajo publicado por Kaaya y colaboradores (1996), en ganado tratado con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se obtuvo una elevada acción ixodocida (76-85%) y una notable reducción en la fecundidad y la eclosión de los huevos. Además de los ensayos sobre administración tópica en animales, también se ha descrito la eficacia ixodocida de los hongos entomopatógenos al aplicarlos en suelo para el control de *I. scapularis* y *Rhipicephalus appendiculatus* (Kaaya y col. 1996; Benjamin y col. 2002; Hornbostel y col. 2004; Stafford y Allan 2010).

Se están desarrollando combinaciones de hongos entomopatógenos con otros productos para ampliar su eficacia. Por ejemplo, se han combinado con éxito con acaricidas de actividad reconocida (Webster y col. 2015), o con productos naturales, como *Melia azedarach*, mostrando un efecto sinérgico beneficioso para el control (Sousa y col. 2011). Además, se han desarrollado estrategias para mejorar la aplicación del hongo. Por ejemplo, impregnando con el hongo el material de anidación que utilizan los ratones silvestres (Hornbostel y col. 2005), o mediante la atracción de las garrapatas con feromonas al área tratada con el hongo (Maranga y col. 2006). Sin embargo, a pesar del esfuerzo, siguen existiendo dificultades prácticas en la aplicación de hongos entomopatógenos para el control de garrapatas en condiciones de campo.

Biopesticidas

Siguiendo la línea de búsqueda de alternativas ecológicas para el control eficaz de garrapatas, se definieron como biopesticidas los productos derivados de microorganismos o productos naturales (European Commission 2008).

Los productos derivados de plantas son particularmente atractivos debido a su baja toxicidad, la escasa permanencia ambiental y la química compleja que dificulta el desarrollo de las resistencias. Algunos de ellos se usan desde la antigüedad.

A principios del siglo XIX, las tribus caucásicas y los persas usaban flores de piretro como método de control frente a los piojos del cuerpo (Casida 1980); el piretro o pelitre de Dalmacia (*Tanacetum cinerariifolium* o *Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Fig. 2.23) es una planta de hoja perenne de la familia de las asteráceas, con propiedades insecticidas de baja toxicidad para los mamíferos. A partir de los años 80, las piretrinas se comercializaron masivamente para el control de plagas, siendo rápidamente sustituidas por sus derivados sintéticos.

Otro derivado de plantas utilizado tradicionalmente es el árbol de neem (*Azadirachta indica*), (Fig. 2.23) perteneciente a la familia Meliaceae que se origina en el subcontinente indio; durante siglos, los indios han confiado en este árbol para fortalecer su salud y remediar decenas de enfermedades, además, se ha utilizado para proteger los alimentos almacenados y como fertilizante y pesticida natural para los campos, ya que interviene en la alimentación de los artrópodos y en los procesos hormonales del desarrollo de los mismos (Schmutterer 1990; Neem Foundation 2018). Ahora es valorado en todo el mundo como una importante fuente de



Fig. 2.23. Ilustraciones de plantas utilizadas como control biológico frente a plagas de artrópodos. A la izquierda, piretro o pelitre de Dalmacia (Köhler 1897); a la derecha, flores de neem (© Snowwhiteimages 2012).

fitoquímicos para su uso en la salud humana y el control de plagas; el aceite de neem contiene al menos 100 compuestos biológicamente activos (Campos y col. 2016).

Los aceites esenciales son producidos naturalmente por las plantas como compuestos secundarios, que se obtienen para uso comercial por varias formas de destilación, y los extractos vegetales se obtienen a través de diversas formas de extracción con disolvente; algunos de ellos destacan por sus propiedades plaguicidas, reguladoras del crecimiento y repelentes o disuasivas (George y col. 2014). Algunas de las familias botánicas más utilizadas son Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae, Meliaceae, Solanaceae y Verbenaceae (Benelli y col. 2016). La mayoría de los estudios del efecto ixodocida de productos naturales, como gramínea de Java, limoneno, comino, pimienta de Jamaica, albahaca y *Lippia*, se han ensayado frente a *R. (B.) microplus* (Martins 2006; Ferrarini y col. 2008; Martinez-Velazquez y col. 2011; Gomes y col. 2012); pero también se han ensayado con éxito en otras especies de garrapatas (Benelli y col. 2016), como el *Senecio adenotrichius* y el aceite esencial del lavandín y la manzanillera en *H. lusitanicum* (Ruiz-Vásquez y col. 2017; Ortiz de Elguea-Culebras y col. 2018).

Otro biopesticida eficaz en el control de garrapatas, es el ácido oxálico, un metabolito del etilenglicol, ubicuo en el medio ambiente, que se utiliza habitualmente para el control de la varroosis en las abejas melíferas de todo el mundo (Gregorc y Planinc 2002; Maggi y col. 2016; Gregorc y col. 2017). Además, se ha descrito como el factor de virulencia del hongo entomopatógeno *B. bassiana* contra garrapatas (Kirkland y col. 2005); pueden encontrarse estudios preliminares de su eficacia frente a la garrapata *H. lusitanicum* como biopesticida en condiciones de laboratorio y bajo condiciones de campo (Olmeda y col. 2008; Valcárcel y col. 2014).

Conscientes del interés de los biopesticidas en el control de patógenos muchos laboratorios focalizaron sus esfuerzos en el cribado de productos naturales, con gran éxito en algunos casos. Un ejemplo de ello son las lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas), obtenidas por la fermentación de actinomicetos a finales de los años 70 (Burg y col. 1979; Takiguchi y col. 1980), y que constituyeron una revolución en el control de los endo y ectoparásitos. Su mecanismo de acción interfiere en los canales de cloro ligados a los receptores glutamato (GluCl), presentes de forma exclusiva en las neuronas y células musculares de los invertebrados; debido a esta interacción con el canal GluCl se produce un incremento en la

permeabilidad al cloro, lo que origina una hiperpolarización de la membrana celular. Independientemente de la vía de administración, su eficacia en el control de garrapatas es controvertida, habiéndose obtenidos resultados muy variables (Davey y George 2002; Perez-Cogollo y col. 2010). Más recientemente, se descubrieron las espinosinas, producidas por la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Thompson y col. 1995), que actúan en el sistema nervioso de los artrópodos, como neurotoxinas, inhibiendo los receptores sinápticos y provocando una excitación constante de la célula nerviosa que les produce fatiga neuromuscular, postración, parálisis y finalmente la muerte (Salgado 1998); sus productos comerciales se administran de forma oral como insecticida o acaricida para el control de plagas, como las garrapatas (Snyder y col. 2009; Valcárcel y col. 2015), donde han demostrado ser eficaces y de acción rápida, con una larga actividad residual y baja toxicidad.

La utilización de productos naturales para el control de garrapatas ofrece ventajas, pero presenta aún determinadas limitaciones. La primera desventaja es la variabilidad de la composición de ciertos productos, como los aceites esenciales, y por ende de su eficacia, para lo que se requiere la identificación y posterior estandarización de las fracciones y posibles sinergias eficaces; otra desventaja, podrían ser las características del producto, como la fotosensibilidad o alta volatilidad, que limitan la actividad residual dependiendo de la forma de presentación (George y col. 2014). Entre las ventajas destaca su papel como alternativa en el control de garrapatas resistentes; su inocuidad ambiental y el mínimo impacto para la salud que facilita su registro y posterior comercialización (CDC 2018c).

2.3.4. Control Integrado

Como ha quedado patente en este apartado, el control de una población de garrapatas es difícil de desarrollar y debe diseñarse para cada especie, teniendo en cuenta su fenología y las condiciones climáticas y el tipo de gestión. Atrás quedó la suposición de que una población de garrapatas se podía controlar, y menos eliminar, exclusivamente mediante la aplicación de un tratamiento acaricida en el momento de máxima exposición. La presión ejercida por tratamientos continuos y mal diseñados, ha llevado a la actual situación de poblaciones de garrapatas resistentes con negativas consecuencias ambientales. La tendencia actual combina estrategias específicas en distintos momentos del ciclo para reducir la plaga, sin eliminarla, es

decir, manteniendo la población dentro de un límite tolerable, con un mínimo impacto ambiental (Stafford y col. 2017).

Así, por término general, no existe una estrategia eficaz por sí sola y es necesario desarrollar un Manejo Integrado de Plagas (del inglés *Integrated Pest Management*). Algunos de estos programas incluyen la aplicación de acaricidas (cada vez menos frecuente por los efectos secundarios) combinada con otras medidas sostenibles, que logren un mejor resultado que el obtenido individualmente. Por ejemplo, para el control de la garrapata *A. americanum* en Estados Unidos, se han llevado a cabo combinaciones de aplicaciones con acaricidas y manejo de vegetación y animales, con mejores resultados que con las técnicas por separado (Eisen y Dolan 2016). Uno de los objetivos, al diseñar un programa de control integrado, es reducir el número de tratamientos, establecer los momentos críticos de aplicación y pautas adecuadas para prevenir la infestación. De esta forma, la prevención es una de las claves del Manejo Integrado de Plagas, junto con el estudio de la población diana y el diseño de acciones estratégicas utilizando los productos más eficaces, seguros y específicos (EPA 2017).

3. Justificación y Objetivos

El éxito de las medidas enfocadas a mantener las poblaciones de garrapatas dentro de límites tolerables para que no constituyan un riesgo para la salud depende, en gran medida, de que se adapten a sus características biológicas y al ecosistema en el que se desarrollan. En este sentido, las garrapatas del ecosistema mesomediterráneo están perfectamente adaptadas a las condiciones climáticas y a la biocenosis del territorio. Hasta la fecha, las referencias específicas del control relativas a garrapatas mesomediterráneas eran escasas y parciales. Esta tesis aborda su control, focalizándose en *Hyalomma lusitanicum*, la especie exófila más abundante, vector de numerosos patógenos y que ha cobrado especial interés a partir de 2016 cuando se diagnosticó el primer caso de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo en España (ECDC 2016).

Para desarrollar un modelo de control, se eligió una finca cinegética de gestión ecológica en la que se pretende mantener en equilibrio el ecosistema mesomediterráneo. Las limitaciones inherentes a este tipo de gestión dirigieron las acciones específicas de control, evitando la utilización de químicos, rescatando prácticas tradicionales e innovando tanto en métodos de aplicación como en la elección de productos ixodicidas.

Este tipo de actuaciones requieren, para su desarrollo y evaluación, periodos de tiempo muy prolongados, adaptados al ciclo anual de los ixódidos. Esta tesis se apoya en la experiencia previa del equipo, complementando estrategias para el desarrollo de un control integrado de las garrapatas mesomediterráneas, a través de los siguientes objetivos:

1. Identificar los momentos estratégicos de control de las principales garrapatas mesomediterráneas, a través de la descripción de su fenología en la vegetación y los hospedadores habituales.
2. Desarrollar un método alternativo de alimentación de *H. lusitanicum* en condiciones de laboratorio.
3. Diseñar un nuevo sistema de aplicación de productos para el control de garrapatas en condiciones de campo.
4. Evaluar la eficacia de estrategias de control de garrapatas compatibles con la gestión ecológica de espacios naturales.

4. Material y Métodos

4.1. Zona de Estudio

4.2. Recogida e Identificación de Garrapatas

4.2.1. Muestreos en vegetación

4.2.2. Muestreos en animales

4.2.3. Identificación y recuento de ejemplares

4.3. Estudio de Garrapatas en el Laboratorio

4.3.1. Mantenimiento de la colonia

4.3.2. Alimentación artificial

4.4. Control de la Población de Garrapatas en un Ecosistema Mesomediterráneo

4.4.1. Control biológico: Hongos entomopatógenos

4.4.2. Manejo de Hospedadores: Exclusión de ungulados

4.5. Análisis Estadístico

4.1. Zona de Estudio

Como modelo de ecosistema mesomediterráneo se seleccionó la finca “La Garganta”, localizada en el suroeste de la provincia de Ciudad Real, limitando con la provincia de Córdoba por el río Guadalmez ($37^{\circ}24'78''\text{N}$ $42^{\circ}59'101''\text{E}$), a una altitud media de 669 metros sobre el nivel del mar, extendiéndose en una superficie de 13 000 Ha (Grosvenor Estate 2018). Esta propiedad debe su nombre a la forma de su territorio, puesto que es un lugar donde confluyen gran diversidad de especies, incluyendo algunas amenazadas como el linco (*Lynx pardinus*) y el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*), y otras especies de interés, como el buitre negro (*Aegypius monachus*) o el conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*). Además, alberga muchas especies representativas de la Península Ibérica como el águila real (*Aquila chrysaetos*), búho real (*Bubo bubo*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), cigüeña negra (*Ciconia nigra*), zorro (*Vulpes vulpes*), ciervo (*Cervus elaphus*), jabalí (*Sus scrofa*), corzo (*Capreolus capreolus*) o liebre ibérica (*Lepus granatensis*), entre otras.

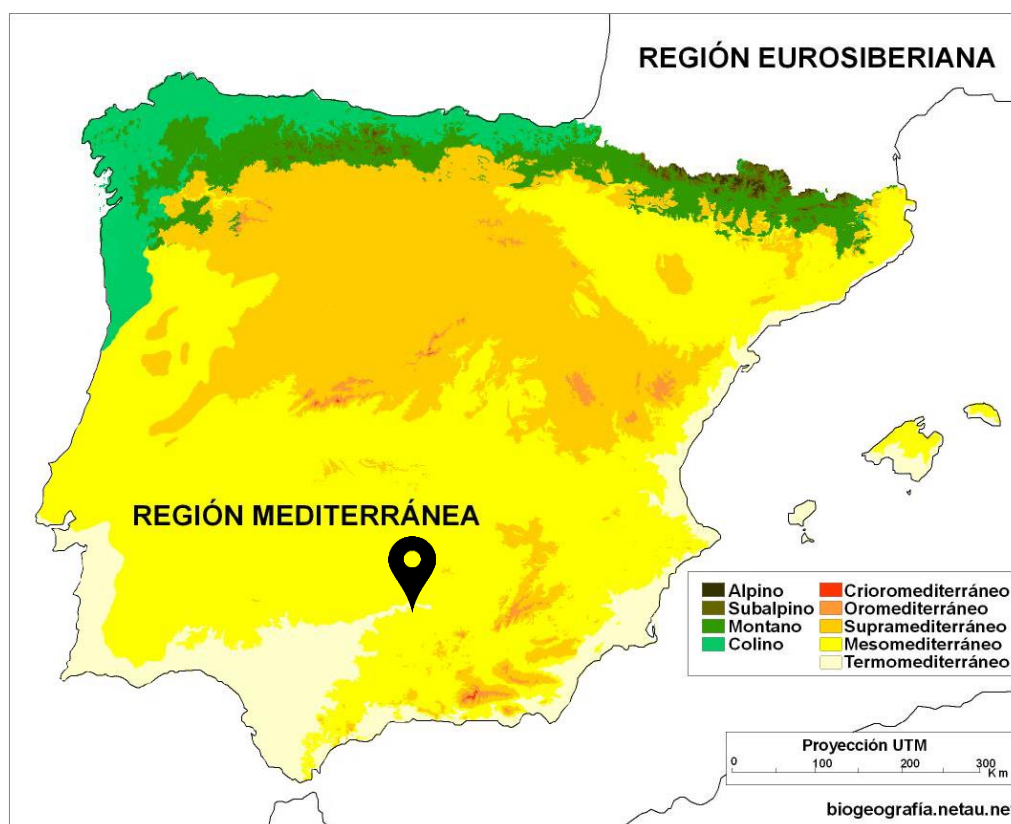


Fig. 4.1. Mapa de los pisos bioclimáticos de la Península Ibérica según Rivas Martínez (1987) (Díaz 2016). Se indica con un punto de localización la situación de la zona de estudio.

La mayoría de su territorio corresponde al piso mesomediterráneo, exceptuando algunas zonas de sierra que forman parte del piso supramediterráneo (Fig. 4.1). Según la clasificación Köppen, su clima es Csa, es decir, templado con verano seco y caluroso (AEMET 2011); la media anual de precipitación es de 650 mm y el rango de temperatura se sitúa entre los -4 y 43 °C. En cuanto a la flora, se encuentran especies bioindicadoras del ecosistema mesomediterráneo, como los bosques de encinas (*Quercus ilex* y *Quercus rotundifolia*), y alcornoques (*Quercus suber*), además de pinos (*Pinus pinea* y *Pinus pinaster*) y eucaliptos introducidos (*Eucalyptus camaldulensis*), con matorrales de lentisco (*Pistacia lentiscus*) y jara (*Cistus ladanifer*), entre otros tipos de vegetación. Existe también cierta actividad agrícola, que incluye un olivar ecológico de 265 ha y 1.000 ha de cereales (avena, trigo, triticale) y plantas aromáticas, además de otras especies arbustivas autóctonas.

Desde 1980 la finca se gestiona de acuerdo a dos prioridades: la conservación del medio natural autóctono y una limitada actividad cinegética. Para ello, se han llevado a cabo ciertas acciones encaminadas a la optimización de este modelo, como la siembra de cereales al tercio, la tala progresiva de la antigua plantación de eucaliptos para la conversión en parcelas de labor, la tala controlada de pinos para favorecer el crecimiento de especies arbóreas y arbustivas, además de las distintas reforestaciones de encinas, alcornoques y lentiscos donde la vegetación es escasa, o la reordenación de las parcelas agrícolas para que los animales tengan comida y refugio. No se utilizan herbicidas ni insecticidas. Las especies de interés son controladas y protegidas, como el ciervo, el jabalí, el corzo, la perdiz y el conejo silvestre, cuya población se considera muy elevada en determinados núcleos, a pesar de su distribución heterogénea. La población de ciervos está controlada por la caza selectiva; se desplazan libremente por la finca (exceptuando alguna zona cercada y el olivar), sin alimentación suplementaria, salvo en años de sequía. Las especies de caza menor disponen de comederos exclusivos, y se han construido majanos para el refugio de los conejos. Por todo ello, se han conseguido recuperar las poblaciones de conejos, liebres y perdiz roja, además de incrementar la calidad de los venados y aumentar las poblaciones de las especies protegidas, siendo la finca con mayor productividad de pollos de águila imperial.

4.2. Recogida e Identificación de Garrapatas

Para lograr un estudio representativo, se seleccionaron seis puntos de muestreo en la finca (Fig. 4.2): tres puntos en distintos encinares, dos puntos en eucaliptales diferentes y un punto en un olivar. Todos ellos albergaban grandes poblaciones de animales, conejos y ciervos en su mayoría (excepto el olivar, que no era accesible a los ciervos, y presentaba fundamentalmente conejos y corzos), hospedadores disponibles para facilitar la presencia de garrapatas. Los muestreos se realizaron desde enero de 2007 hasta diciembre de 2014. Mensualmente se recogieron garrapatas de la vegetación y los animales, siguiendo distintas metodologías.

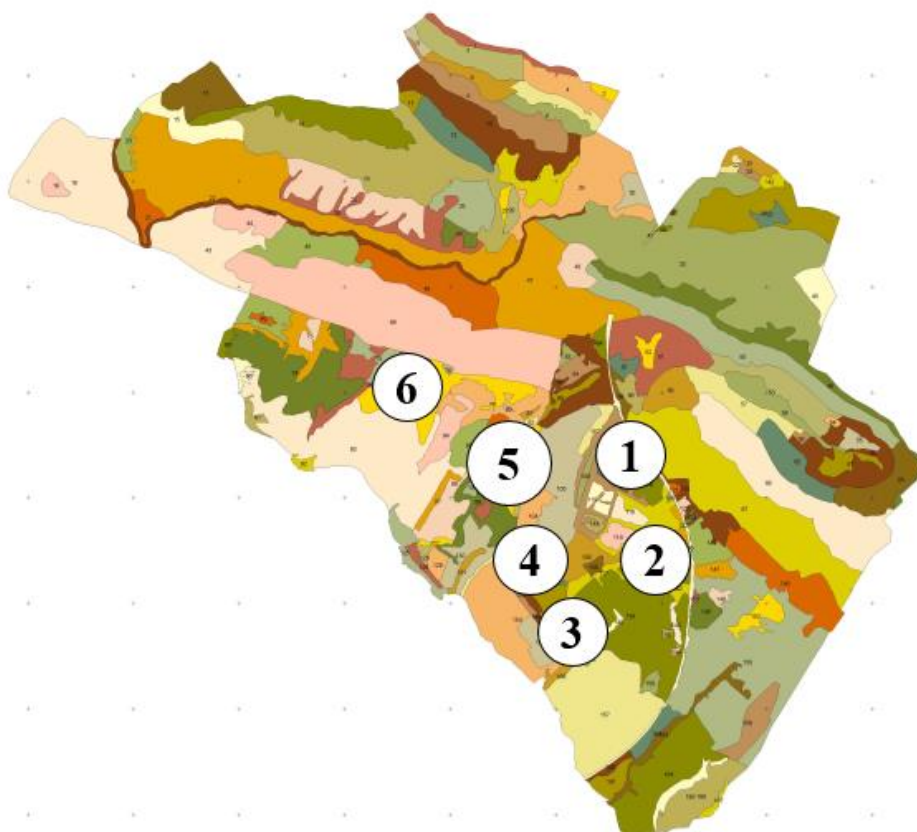


Fig. 4.2. Mapa de la zona de estudio con la localización de los seis puntos de muestreo: (1) Olivar, (2) Eucaliptal A, (3) Encinar A, (4) Eucaliptal B, (5) Encinar B, (6) Encinar C.

4.2.1. Muestreos en Vegetación

Las garrapatas se recogieron de la vegetación mediante la técnica de la bandera (Sonenshine 1993). Esta técnica consiste en arrastrar lentamente sobre el suelo una tela de felpa blanca de 2 m² durante 30 minutos, recogiendo manualmente las garrapatas de la tela cada 3-5 minutos. En cada punto de muestreo se completó una ficha (ver Anexos), donde se anotaron datos de climatología, como la humedad relativa y la temperatura del ambiente y a ras del suelo, con un termohigrómetro (Lufft® E200), y datos cualitativos, como la altura de la vegetación y la velocidad relativa del viento, además de otras observaciones de interés para el estudio. Los ejemplares se trasladaron al laboratorio vivos, en viales de recogida de plástico (4 cm de alto; 3,7 cm de diámetro) con tapa perforada (Fig. 4.3), para su posterior identificación.



Fig. 4.3. Imágenes de la metodología que se llevó a cabo en los muestreos de vegetación. Técnica de la bandera en las imágenes superiores; detalle de una garrapata en la manta y los viales de recogida en las imágenes inferiores.

4.2.2. Muestreos en Animales

La gestión de la finca, que dispone de un Plan de Ordenación Cinegético, permitía la captura mensual de un número justificado de animales, por lo que podían ser examinados entre dos y tres conejos por punto de muestreo, y uno o dos ciervos cada mes.

Las canales con piel de los conejos silvestres capturados fueron suspendidas durante 24 horas sobre recipientes independientes con agua, donde posteriormente se recogían las garrapatas desprendidas de cada cadáver, filtrando el agua a través de una gasa (Fig. 4.4). Además, se revisaban las bolsas que transportaban a los conejos desde el lugar de captura hasta el punto de inspección.

Por el contrario, los ciervos fueron examinados recién abatidos para recoger las garrapatas encontradas por observación directa, con pinzas de acero inoxidable (Fig. 4.4).



Fig. 4.4. Imágenes de la metodología que se llevó a cabo en los muestreos de animales. Técnica de recogida de garrapatas de los conejos a la izquierda; detalle de garrapatas fijadas en los ciervos en la derecha.

Los ejemplares se recogieron en botes de plástico individuales con tapa de rosca (6 cm de alto; 3 cm de diámetro) sumergidos en alcohol al 70 %, a excepción de las hembras grávidas y los estadios alimentados que se reservaron vivos en viales de plástico aparte (4 cm de alto; 3,7 cm de diámetro) con tapa perforada. Todos fueron identificados posteriormente en el laboratorio, donde se completó una ficha por animal inspeccionado (ver Anexos).

4.2.3. Identificación y Recuento de Ejemplares

Una vez en laboratorio, las garrapatas obtenidas fueron identificadas según su estadio mediante guías de clasificación especializadas (Hoogstraal y Morel 1970; Gil-Collado y col. 1979; Manilla 1998; Estrada-Peña y col. 2004a; Apanaskevich y col. 2008b), utilizando estereomicroscopios binoculares (Motic® SMZ-168-TL y Nikon® SMZ25) (Fig. 4.5).



Fig. 4.5. Imagen de una garrapata obtenida con el estereomicroscopio binocular Nikon® SMZ25.

Tras el recuento mensual por punto de muestreo, se determinó el índice de abundancia de garrapatas en vegetación, TAR (del inglés *Tick Abundance Rate*), calculado a partir del número de garrapatas recogidas por minuto en un tiempo estimado de 100 minutos (Barandika y col. 2011), y el índice de parasitación por garrapatas, PI (del inglés *Parasitization Index* o *Parasitic Indicator*), definido como abundancia (Margolis y col. 1982), a partir del número de garrapatas recogidas entre el número de animales examinados.

4.3. Estudio de las Garrapatas en el Laboratorio

Para conocer la biología de las garrapatas del estudio, era fundamental mantener una colonia en el laboratorio a partir de los ejemplares vivos encontrados. Según el estadio y grado de alimentación observado, se procedió a su conservación de una forma distinta.

4.3.1. Mantenimiento de la Colonia

Las hembras grávidas o alimentadas obtenidas durante los muestreos de animales, AF (del inglés *Animal Feeding*), eran reservadas individualmente en tubos de ensayo de cristal con un papel plisado (para facilitar su agarre vital), cerrados con algodón, y mantenidas en un incubador bajo condiciones controladas de laboratorio (a 25 °C y 85 % de humedad relativa), con un ciclo de luz natural-oscuridad, para realizar un seguimiento de los tiempos y la progresión de su oviposición, y consiguiente eclosión de los huevos (Fig. 4.6). Se definieron dos períodos: “pre-oviposición”, como el tiempo requerido desde que se recoge la hembra hasta que comienza a poner huevos, y “oviposición-eclosión”, como el período desde que termina la pre-oviposición hasta que eclosiona el primer huevo.



Fig. 4.6. Imagen de la colonia en el incubador del laboratorio con los ejemplares recogidos vivos.

Los otros estadios alimentados (larvas y ninfas alimentadas) se mantuvieron bajo las mismas condiciones de laboratorio (25 °C, 85 % de humedad relativa y un ciclo natural de luz-oscuridad), para facilitar el desarrollo de su muda. Todos los ejemplares recogidos de un mismo animal se guardaban juntos en el mismo tubo de ensayo.

4.3.2. Alimentación Artificial

Algunos de los adultos recogidos de la vegetación en disposición de búsqueda activa, se reservaron también en condiciones de laboratorio para alimentarlos después artificialmente mediante un sistema de membranas, MF (del inglés *Membrane Feeding*). La técnica fue descrita por Kröber y Guerin (2007a,b), pero se modificaron ciertos aspectos para adaptarla a las características fisiológicas de *H. lusitanicum* y al desarrollo práctico de la misma. Esta metodología se basa en simular artificialmente las características de la piel de un hospedador, como el grosor o la elasticidad, mediante una membrana de silicona.

La membrana se elaboró a partir de una base de papel óptico (70 x 120 mm; Tiffen®), dispuesta sobre una superficie de papel film plástico, estirado para evitar impurezas, donde se aplicó una mezcla de: 1,875 g de silicona (Wacker ELASTOSIL® E4, baja dureza A; 16°), 0,562 g de aceite de silicona (Sigma-Aldrich®) y 0,365 g de hexano (Sigma-Aldrich®), que se extendía con una espátula hasta conseguir un espesor de entre 70 y 100 µm, adecuado a la longitud del hipostoma de la especie en estudio (Fig. 4.7). La mezcla se dejó polimerizar en condiciones de laboratorio (25 °C y 85 % de humedad relativa) durante 12 horas. Después se adhirieron las

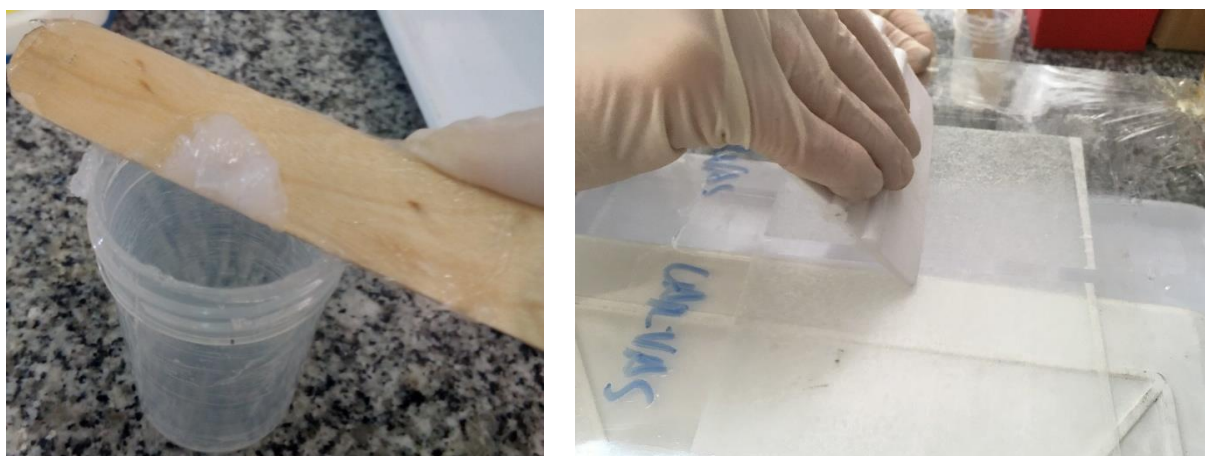


Fig. 4.7. Imágenes de la elaboración de membranas de silicona para la alimentación artificial.

unidades de alimentación a la membrana con silicona, cuidando de no sobrepasar los bordes de la unidad, y se dejaba polimerizar de nuevo 4-5 horas.

Las unidades de alimentación se fabricaron con metacrilato, según el diseño de Kröber y Guerin (2007a), en el taller mecánico del Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Complutense de Madrid. Cada unidad tenía unas dimensiones de 45 mm de altura, 26 mm de diámetro interno y 2 mm de espesor, y llevaba soldado un anillo externo de metacrilato por debajo de su línea media, para permitir que se pudieran ser introducidos 4 mm de su altura en un pocillo (5 mm de altura; 3,5 mm de diámetro) de una placa de cultivo (Nunclon™ Delta Surface Thermo Fisher Scientific®).

Transcurrido este último tiempo, se recortaban individualmente y se comprobaban el espesor de su membrana con un calibre digital (DEXTER®) (Fig. 4.8), y la estanqueidad de cada unidad, introduciéndola en una placa Petri de cristal con alcohol al 70 % hasta una altura de 4 mm, durante 20 minutos.



Fig. 4.8. A la izquierda, imagen de la comprobación del espesor de la membrana de una unidad de alimentación artificial; a la derecha, unidades de alimentación con el extracto de pelo añadido.

Una vez montada la unidad, se añadieron en su interior una serie de elementos para facilitar la sustentación de la garrapata: un círculo de mosquitera de plástico cubriendo toda la superficie, pegado también con silicona, y una cruceta de plástico blanco. Finalmente, para estimular la alimentación de las garrapatas y simular la situación natural de un hospedador, se agregaba pelo de ciervo y extracto de pelo de vaca (obtenido según la metodología descrita por Kröber y Guerin (2007a)), que se dejaba evaporar 15 minutos antes de su uso (Fig. 4.8).

En cada unidad de alimentación, se ponían entre 6-10 hembras y 4-5 machos de *H. lusitanicum* (Fig. 4.9). Antes de la alimentación artificial, los adultos fueron adaptados a las condiciones de laboratorio (25 °C, 85 % de humedad relativa y un ciclo natural de luz-oscuridad) durante 3 meses de media, con el fin de estimular más su instinto de búsqueda de hospedador. Finalmente, las unidades se cerraban con tapones porosos de plástico (CORNING FALCON®).



Fig. 4.9. De izquierda a derecha; imagen de una unidad de alimentación completa; varias placas con distintas unidades flotando en el baño termostático; y una imagen del interior de una unidad con tres hembras desprendidas que ya han completado su alimentación.

Para el desarrollo experimental, se utilizaron las placas de cultivo anteriormente mencionadas; en cada pocillo se añadían 2,8 ml de sangre comercial desfibrinada de ovino (OXOID®) mantenida a -20 °C y descongelada a 4 °C para su uso. Previamente, cada mililitro de sangre se suplementaba con 1,3 µl de una solución de Gentamicina (5 mg/ml en agua desionizada; Sigma-Aldrich®) y 1,3 µl de ATP (100 mM; Thermo Fisher Scientific®). La mezcla se precalentaba a 37 °C en una placa calefactora (BUNSEN®). Sobre cada pocillo, se disponía una unidad de alimentación, sin formar burbujas, y se dejaba flotar la placa de cultivo en un baño termostático a 37 °C (Memmert®) (Fig. 4.9). La sangre se reemplazaba cada 12 horas, y en cada cambio, la superficie externa de las membranas se limpiaba cuidadosamente con agua destilada precalentada (37 °C); además se completaba una ficha de seguimiento (ver Anexos).

Las hembras grávidas obtenidas durante la alimentación artificial eran mantenidas en condiciones de laboratorio. También se recogieron datos sobre el peso de las hembras grávidas y los tiempos de pre-oviposición y oviposición-eclosión.

4.4. Control de la Población de Garrapatas en un Ecosistema Mesomediterráneo

Para llevar a cabo un control poblacional de las garrapatas, se aplicaron distintas estrategias de control específicas y ecológicas, sin alterar el equilibrio del ecosistema. El conejo silvestre fue el hospedador diana elegido para el desarrollo de los ensayos de campo que tuvieron lugar durante la época de máxima parasitación por garrapatas.

4.4.1. Control Biológico: Hongos Entomopatógenos

Esta estrategia de control fue diseñada con el fin de aplicar un tratamiento directamente en el interior de cada entrada de la conejera, utilizando una sopladora (Stihl BR 420 Andreas Stihl S.A.) a una descarga de 1,27 litros por minuto (la dosis media por entrada era de unos 635 ml aproximadamente, siendo el tiempo máximo de aplicación 30 segundos).



Fig. 4.10. A la izquierda, una imagen de la aplicación del producto con sopladora; a la derecha, detalle de una madriguera tratada con el producto acibelte.

Se administró Botanigard® (Mycotech Corporation), un insecticida biológico comercializado para cultivos vegetales, formulado a base del hongo *Beauveria bassiana* (Cepa GHA; concentración $2,11 \times 10^{10}$ conidios/ml equivalente a 10,6% p/v), que fue aplicado en dos disoluciones acuosas: la disolución concentrada de $1,62 \times 10^9$ conidios/ml, BBCS (del inglés *B. b concentrated solution*), y la disolución diluida de $2,43 \times 10^8$ conidios/ml, BBDS (del inglés *B. b diluted solution*). Como control positivo del tratamiento se utilizó acibelte (PROBELTE S.A.), un insecticida piretroide que contiene cipermetrina al 10% p/v (100 g/l), CT (del inglés *Cypermethrin treatment*) (Fig. 4.10).

Diseño experimental

Se llevaron a cabo dos ensayos de campo, durante la primavera y el verano de 2013, en las conejeras de distintas áreas seleccionadas de la zona de estudio (Fig. 4.11).

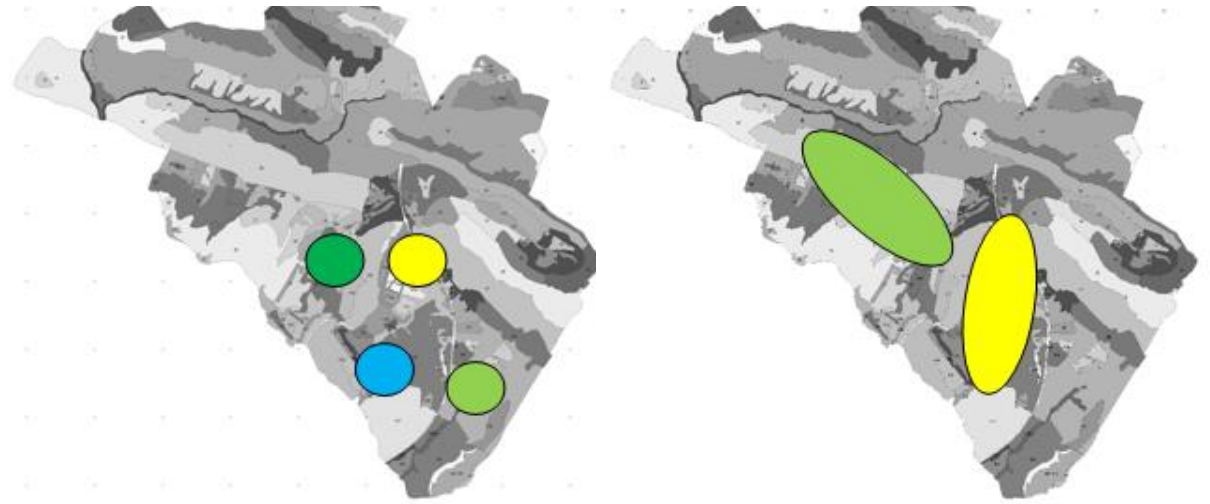


Fig. 4.11. Mapa de la zona de estudio. A la izquierda, se señalan las áreas tratadas en el ensayo preliminar de primavera; a la derecha, se señalan las áreas tratadas en el ensayo de verano. Color amarillo: control, verde claro: *Beauveria bassiana* diluido, verde oscuro: *B. bassiana* concentrado, azul: control positivo.

En el ensayo preliminar de primavera, PST (del inglés *Preliminary Spring Trial*), se administraron tres tratamientos en marzo, uno con acibelte (CT) y dos con las distintas concentraciones de *B. bassiana* (BBCS y BBDS), en 4 áreas aisladas pero similares en cuanto a fauna y flora. Una de ellas no recibió ningún tratamiento NT (del inglés *Not Treatment*) para confirmar la fenología natural de las garrapatas en estudio. Se trataron 13 conejeras: 4 con BBCS (26 entradas), 2 con BBDS (34 entradas) y 3 con CT (14 entradas), además de 4 conejeras como control (NT).

En verano se llevó a cabo un ensayo más largo, ST (del inglés *Summer Trial*), para evaluar la eficacia del tratamiento con la disolución BBDS. Un total de 1.704 conejeras fueron tratadas en junio. Las conejeras tenían una media de 9,69 entradas (dentro del rango 1-181), aplicándose 2,53 litros de media por conejera (entre 0,25-41,70 litros). Otra área de similares características y extensión fue utilizada como control (NT).

Evaluación del ensayo

Según la densidad de hospedadores presente en el área tratada, se capturaron y sacrificaron entre 5 y 17 conejos para determinar el índice de parasitación por garrapatas (PI), según la metodología descrita en los muestreos en animales. En el PST se capturaron 72 conejos, y sólo se consideraba el recuento global de garrapatas para analizar a los 30 y 60 días post-tratamiento. En el ST se capturaron 60 conejos y, además de evaluar el recuento calculado en los días 30, 60 y 90 post-tratamiento, se tuvo en cuenta el efecto a nivel de cada especie de garrapata.

4.4.2. Manejo de Hospedadores: Exclusión de Ungulados

Para este ensayo de control, se seleccionaron dos áreas en la finca, similares en cuanto a la vegetación, pero de distinta composición faunística por el efecto de una barrera cinegética de 2 m de alto construida hace 16 años (Fig. 4.12). El área cerrada (340 ha), estaba localizada al sur, con una población mayoritaria de perdices, conejos y liebres, rodeada de una barrera que impedía el acceso a los ciervos. El área abierta (500 ha), estaba situada al centro-oeste de la finca y presentaba la misma fauna que la anterior, además de los ciervos que se desplazaban libremente.



Fig. 4.12. Imagen de la barrera cinegética que separa las dos áreas del estudio de exclusión de hospedadores.

Diseño experimental

En el mes de Julio de 2013 se capturaron 100 conejos, 50 de cada zona (Fig. 4.13), mediante la práctica tradicional de cercado con redes, una modalidad que se aplica en territorios próximos a las madrigueras, autorizada en áreas donde la densidad de población del conejo es elevada (Barreda y Martínez 2009).

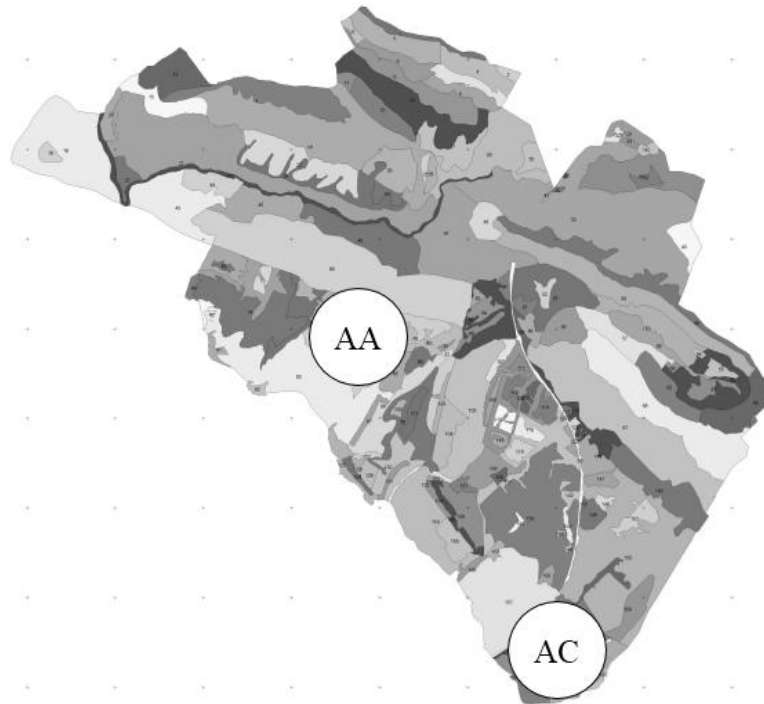


Fig. 4.13. Mapa de la zona de estudio con la localización de las dos áreas del ensayo: (AA) Área Abierta y (AC) Área Cerrada.

Evaluación del ensayo

Todos los conejos fueron sacrificados para determinar el índice de parasitación por garrapatas (IP), según la metodología descrita en los muestreos en animales (apartados 4.2.2-3).

4.5. Análisis Estadístico

El procesamiento de los datos y el análisis de los resultados se detallan específicamente en cada publicación. Se utilizó el software estadístico IBM® SPSS® Statistics 20 (SPSS Inc. 2011) para evaluar la distribución y varianza de las poblaciones en estudio y aplicar, en consecuencia, los test estadísticos más adecuados.

5. Publicaciones

- 5.1. Long-Term Ecological Study of Host-Seeking Adults of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean Climate** (Estudio a Largo Plazo de los Adultos en Búsqueda Activa de *H. lusitanicum* en un Clima Mesomediterráneo)
- 5.2. Long Term Study of Ixodid Ticks Feeding on Red Deer (*Cervus elaphus*) in a Meso-Mediterranean Climate** (Estudio a Largo Plazo de los Ixódidos que se Alimentan del Ciervo en un Clima Mesomediterráneo)
- 5.3. Seasonal Dynamics of Ixodid Ticks on Wild Rabbits *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae) from Central Spain** (Dinámica Estacional de los Ixódidos del Conejo Silvestre en la Zona Centro de España)
- 5.4. In vitro feeding of *Hyalomma lusitanicum* ticks on artificial membranes** (Alimentación *in vitro* de Garrapatas *H. lusitanicum* con Membranas Artificiales)
- 5.5. Control of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) Ticks Infesting *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) Using the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Hyocreales: Clavicipitaceae) in Field Conditions** (Control de la Garrapata *H. lusitanicum* que Parasita al Conejo Silvestre Mediante el Hongo Entomopatógeno *B. bassiana* en Condiciones de Campo)
- 5.6. The effect of excluding ungulates on the abundance of ixodid ticks on wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)** (El Efecto de Excluir Ungulados en la Abundancia de Ixódidos del Conejo Silvestre)

Short Communication

Long-Term Ecological Study of Host-Seeking Adults of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean Climate

F. Valcárcel,^{1,2} J. González,³ J. L. Pérez Sánchez,³ J. M. Tercero Jaime,³ and A. S. Olmeda⁴

¹Grupo de Parasitología, Centro de Investigación en Sanidad Animal Center (INIA-CISA), 28130-Valdeolmos, Madrid, Spain (valcarcel.felix@inia.es), ²Corresponding author, e-mail: valcarcel.felix@inia.es, ³Finca La Garganta (Villamagna SA) 14440 Villanueva de Córdoba (Córdoba, Spain) (julsglezglez@gmail.com; jose_luis_perez_sanchez@hotmail.com; jmtercero@fincalagarganta.com), and ⁴Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain (angeles@ucm.es)

Received 2 June 2015; Accepted 12 September 2015

Abstract

From January 2007 to December 2014, three representative meso-Mediterranean bioclimatic environment types were sampled monthly using blanket-dragging techniques to determine the tick abundance rate. *Hyalomma lusitanicum* Koch, 1844 was the most prevalent species (96.58%) followed by *Dermacentor marginatus* Sulzer, 1776; *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1936; and *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1878. *H. lusitanicum* adults begin questing activity around March, numbers rising quickly reaching their peak in May–June and then diminishing until the end of the year, with a small increase in September–October. This pattern was clear and constant throughout the years, irrespective of the microclimate or biotope tested.

Key words: *Hyalomma lusitanicum*, host-seeking tick pattern, meso-Mediterranean, climate

Ticks are blood-sucking ectoparasites that can transmit a great variety of pathogens to human and animals. So, the control of ticks, and tick-borne diseases, is the most important health management problem in many areas. They are adapted to very different habitats, and specific control measures against them should be based on local tick phenology.

Hyalomma lusitanicum Koch, 1844 is a vector of tropical theileriosis (Habela et al. 1999), and several zoonotic pathogens have been detected in this species (Toledo et al. 2009, Estrada-Peña et al. 2012).

The aim of this study is to describe the questing activity of *H. lusitanicum* in a meso-Mediterranean area in order to define risk periods and establish specific control measures.

Materials and Methods

Study Area

The study was carried out from January 2007 to December 2014 in a natural plant and animal reserve in Central Spain (37° 24'78" N; 42° 59'101" E; HT669m). The study site covers an area of 13,000 ha, altitude 500–1,266 meters above sea level, annual average rainfall 650 mm, and temperatures ranging from –4 to 43°C. According to

the Köppen classification, the climate is Csa (temperate with dry or hot summers; Agencia Estatal de Meteorología [AEMET] 2011).

Six sampling sites (SS) were selected:

- The olive grove (*Olea europea* L., 1753) SS with rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L., 1758) and roe deer (*Capreolus capreolus* L., 1758).
- Three evergreen oak (*Quercus ilex* L., 1753) SS with rabbits and red deer (*Cervus elaphus* L., 1758).
- Two eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill, 1800) SS with rabbits and red deer.

Ground temperature and relative humidity were measured by a hand-held thermo-hygrometer (Lufft E200, Germany) as well as qualitative data such as grass height and relative wind speed were estimated (Table 1).

Questing Tick Collection

Ticks were collected monthly in all of the six SS using the blanket-dragging technique (Sonenshine 1993) with a 1- by 2-m white towel. Samplings were carried out by three two-people teams, sampling 10 min per team and SS (total: 30'/SS) checking the drag every 3–5 min. Each team represented one replicate of each SS in order to avoid



Long term study of ixodid ticks feeding on red deer (*Cervus elaphus*) in a meso-Mediterranean climate

F. Valcárcel¹ · J. González² · J. M. Tercero Jaime² ·
A. S. Olmeda³

Received: 10 October 2015 / Accepted: 18 December 2015 / Published online: 29 December 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract Red deer (*Cervus elaphus* L.) are very valuable in trophy-hunting but also contribute to the preservation of natural areas. They are affected by many parasites and pathogens, including hard ticks that are not only important parasites themselves but can also act as vectors and/or reservoirs of pathogens. Tick phenology is complex insofar as population dynamics depend on environmental conditions, vegetation, host availability and their own intrinsic characteristic. Ticks were collected monthly from January 2007 to December 2014 from red deer on a natural reserve located in a meso-Mediterranean environment in Central Spain. A total of 8978 specimens of ixodid ticks were recovered with a mean Parasitization Index of 65.06 ticks/deer. Red deer were infected the whole year round with a summer-spring pattern and two secondary peaks in February and October. The main species was *Hyalomma lusitanicum* Koch followed by *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, *Dermacentor marginatus* Sulzer and *Ixodes ricinus* L. *Hyalomma lusitanicum* has a complex life cycle in which several generations initiate their cycle at different times throughout the year, most probably lasting more than 1 year. We also describe the ability of nymphs to feed on large ungulates even though their habitual host is wild rabbit.

Keywords Red deer · *Hyalomma lusitanicum* · *Rhipicephalus bursa* · *Rhipicephalus pusillus* · *Dermacentor marginatus* · *Ixodes ricinus* · Seasonal frequency

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10493-015-0008-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ F. Valcárcel
valcarcel.felix@inia.es

¹ Grupo de Parasitología, Centro de Investigación en Sanidad Animal Center (INIA-CISA),
28130 Valdeolmos, Madrid, Spain

² Finca “La Garganta”, Villamagna, SA, Italy

³ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,
28040 Madrid, Spain

Introduction

The decline in rural population and farming activities has led to change in land use and allowed nature to recover many abandoned areas transforming them into hunting and game reserves and nature reserves. The population of red deer (*Cervus elaphus* L.) has been expanding in recent decades (Gortázar et al. 2000; Carranza 2011). This ungulate is highly considered among trophy hunters, but also contributes to the preservation of natural areas under proper population management conditions (Carranza 1999). Wildlife diseases are one of major biological factors influencing the animal population management, and they are handled on three levels: prevention, control and eradication (Gilbert and Dodds 1992; Wobeser 1994). The main diseases affecting red deer have already been identified, however, they are not easy to control for many reasons, including the reduced management of these animals and complex life cycles of many of their pathogens. Control is even more difficult in vector-borne diseases, where vector-host interaction is key in the transmission of pathogens (Perkins et al. 2003; Paull et al. 2011).

Iberian hard tick fauna is composed by over 30 species (Estrada-Peña 1994; Cordero del Campillo et al. 1994). These are important parasites on their own (García Romero et al. 2000; Olmeda et al. 2001; Ruiz-Fons et al. 2006, 2013), but they can also act as vectors and/or reservoirs of pathogens (Habela et al. 1999; Toledo 2007; Toledo et al. 2009; Estrada-Peña et al. 2012). Some are able to feed on other wild or domestic animals and humans. An example is *Hyalomma lusitanicum* Koch, which has been collected from many different animal species (Cordero del Campillo et al. 1994) and it is frequently reported attaching to humans as well (Santos-Silva et al. 2011).

The phenology of ticks is complex, because population dynamics depend on environmental conditions, vegetation and host availability (Estrada-Peña 2008), but are also influenced by intrinsic characteristic (Pegram and Perry 1986).

Combating ticks is particularly difficult because they can survive for long periods of time in the field, in different habitats where they infest different hosts throughout the year. Indeed, each tick species is associated with certain ecological niches, where they find an ideal microclimate and suitable hosts (Gray et al. 2009). In consequence, rational control programs must be carefully designed for every stage and species, and the correct place and time must be chosen to implement the strategies. The aim of this study is to describe tick feeding patterns on red deer in a meso-Mediterranean area to contribute to the design of control strategies.

Materials and methods

Study area

The study was carried out in a natural reserve in Ciudad Real (Central Spain: 37°24'78"N 42°59'101"E) covering an area of 13,000 ha at a mean altitude of 669 meters above sea level; annual average rainfall is 650 mm and temperatures range from −4 to 43 °C. The reserve is home to a large population of wild fauna representative of the meso-Mediterranean bioclimatic environment. No domestic animals are present. A more extensive description can be seen in Valcárcel et al. (2014).

Tick sampling

Data on tick activity were collected monthly from January 2007 to December 2014 on 138 hunter killed red deer from forests around the study area. The entire body of the animals was carefully examined for ticks which were manually removed using tweezers and a paintbrush, and kept in 70 % alcohol for subsequent classification at the laboratory. The Parasitization Index was expressed as the average number of ticks per host.

Specific keys were used to identify the different tick stages (Gil Collado et al. 1979; Manilla 1998; Apanaskevich et al. 2008). Specimens are kept in the tick collection belonging to Dr. A. S. Olmeda of the Animal Health Department, Veterinary Faculty of the Complutense University of Madrid.

Results

We collected a total of 8978 ixodid ticks, the highest number occurring between May and October (Table 1). Five ixodid species were identified on 133 of the 138 red deer sampled (96.33 %) with a mean Parasitization Index of 65.06 ticks/deer (min = 0, max = 343). The main species affecting red deer were *H. lusitanicum*, followed by *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago. *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, *Dermacentor marginatus* (Sulzer) and *Ixodes ricinus* (L.) were minority species found during all months (Fig. 1). Tick infestation followed a negative bimodal distribution with a few red deer harbouring most of the ticks (Fig. 2) and a summer-spring pattern of total tick infestation with two secondary peaks in February and October although red deer were infested the whole year round (Fig. 3).

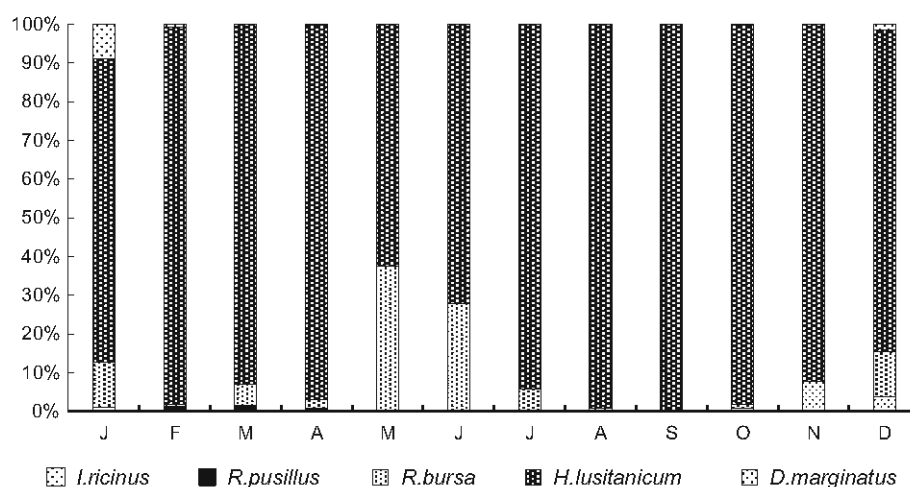
Regarding the monthly Parasitization Index pattern, the year starts with minimum values followed by a short peak in February. Infestation levels decrease in March and then gradually rise during the spring reaching their maximum level in July. Parasitization Index then gradually declines reaching the lowest values in December but with a small peak in October (Fig. 3). Adults, predominantly males, were the most abundant stage followed by nymphs and larvae (78.41, 20.80, and 0.79 % respectively). We found adults of all five species of ticks. Males (49.63 %) were more abundant than females (28.78 %), especially during cold months with a mean sex ratio of 1.79 ♂/♀ from October to January. However, in November and December this sex ratio increased notably from 3.00 to 13.38 ♂/♀. We also found nymph stages of *H. lusitanicum* and *R. bursa* but the only larvae collected were of the majority species.

Hyalomma lusitanicum was the most abundant tick species found during all the months of the year, accounting for 62.56 % of total ticks found in May to 100 % in September (Fig. 1). Its seasonality and sex ratio therefore coincide with the global data mentioned earlier. Within this monthly pattern, it is important to note that the number of adults did not vary significantly during the period of highest tick infestation, i.e. May–October (Fig. 4). The maximum Parasitization Index of global pattern observed in July is due to a brief increase in the number of nymphs of this species and not in the number of adults. During the coldest months (November–January), the number of adults decreased notably, especially the females. Another key point providing insight into the pattern of this species is that engorged females were collected during the entire year.

Rhipicephalus bursa was the second most abundant species. Although it was collected in most months, important numbers found feeding on red deer were limited to the spring. In fact, there were practically no adults found during the first four and the last 5 months of the

Table 1 Number of ticks collected and Parasitization Index (mean average) of the different stages of ixodid ticks feeding on red deer in a Mesomediterranean area from January 2007 to December 2014

	Red deer	Larvae		Nymphs		Males		Female		Total	
		n	PI	n	PI	n	PI	n	PI	n	PI
J	7	–	–	12	1.71	55	7.86	35	5.00	102	14.57
F	9	–	–	3	0.33	566	62.89	216	24.00	785	87.22
M	11	–	–	14	1.27	166	15.09	63	5.73	243	22.09
A	11	–	–	7	0.64	330	30.00	189	17.18	526	47.82
M	13	–	–	13	1.00	880	67.69	536	41.23	1429	109.92
J	15	1	0.07	424	28.27	626	41.73	461	30.73	1512	100.80
J	13	70	5.38	1173	90.23	372	28.62	259	19.92	1874	144.15
A	16	–	–	161	10.06	602	37.63	335	20.94	1098	68.63
S	14	–	–	35	2.50	390	27.86	262	18.71	687	49.07
O	8	–	–	5	0.63	347	43.38	215	26.88	567	70.88
N	5	–	–	6	1.20	15	3.00	5	1.00	26	5.20
D	16	–	–	14	0.88	107	6.69	8	0.50	129	8.06
Total	138	71	0.51	1867	13.53	4456	32.29	2584	18.72	8978	65.06

**Fig. 1** Monthly percentage of different ixodid tick species feeding on red deer in an area from Central Spain area from January 2007 to December 2014

year (Fig. 5). We collected approximately 1.30 ♂/♀ with maximum values from May to August. *R. bursa* nymphs were either not found or found in very low numbers throughout the year and, surprisingly, the highest numbers of this immature stage appeared in July, once adults had decreased to minimum values. Few examples of the other three species were collected from red deer (Fig. 6) and only adults which had a very low Parasitization Index. *Rhipicephalus pusillus* was only collected during 4 months, February, March, April and July with a ♂/♀ ratio of 1.71; *D. marginatus* was collected irregularly from October to April with a 0.80 ♂/♀ sex ratio; finally, *I. ricinus* appeared from October to February with a ♂/♀ sex ratio of 0.83.

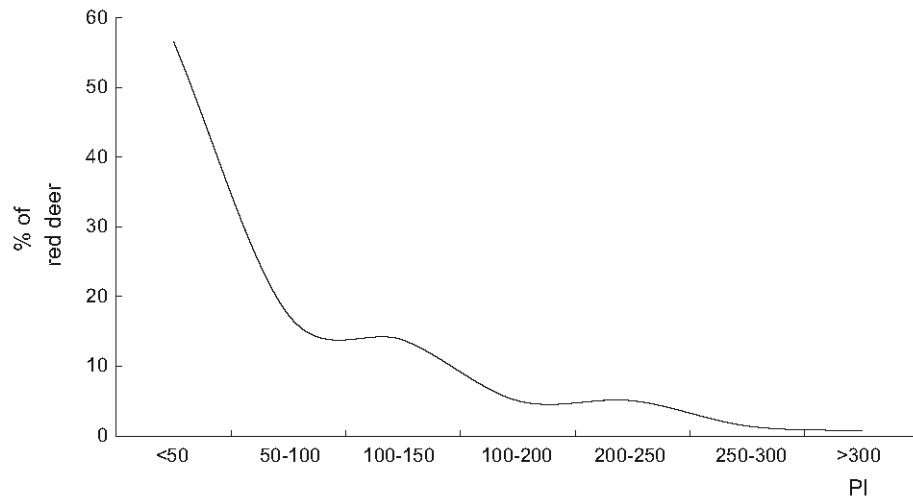


Fig. 2 Distribution of ixodid tick population feeding on red deer in an area from Central Spain area, from January 2007 to December 2014. *PI* Parasitization Index (mean average)

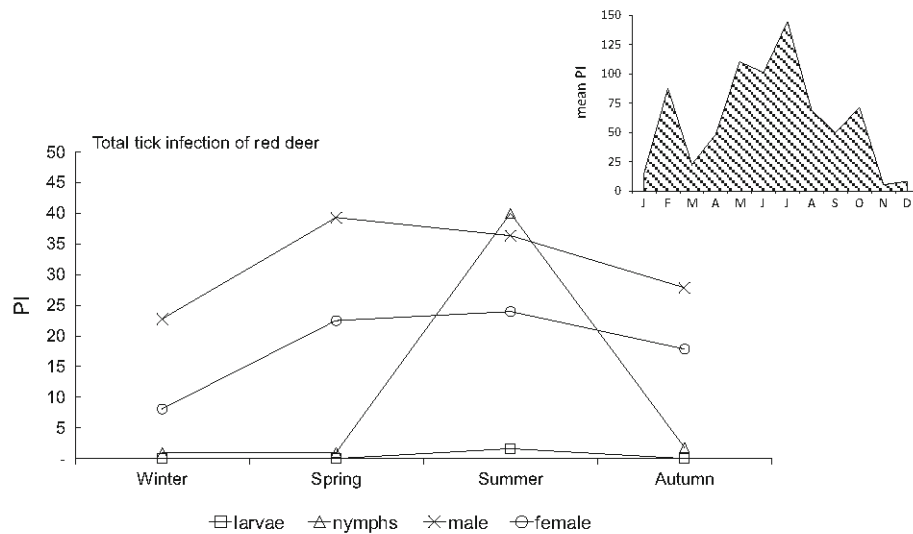


Fig. 3 Seasonal pattern of tick infection of red deer in a meso-Mediterranean area from January 2007 to December 2014. In *upper right corner* is represented the monthly pattern of global tick infection. *PI* Parasitization Index

Discussion

Tick infestation showed a negative binomial distribution typical of most parasitic diseases (Shaw and Dobson 1995; Pal and Lewis 2004) with less numbers of species than in other studies (Cordero del Campillo et al. 1994).

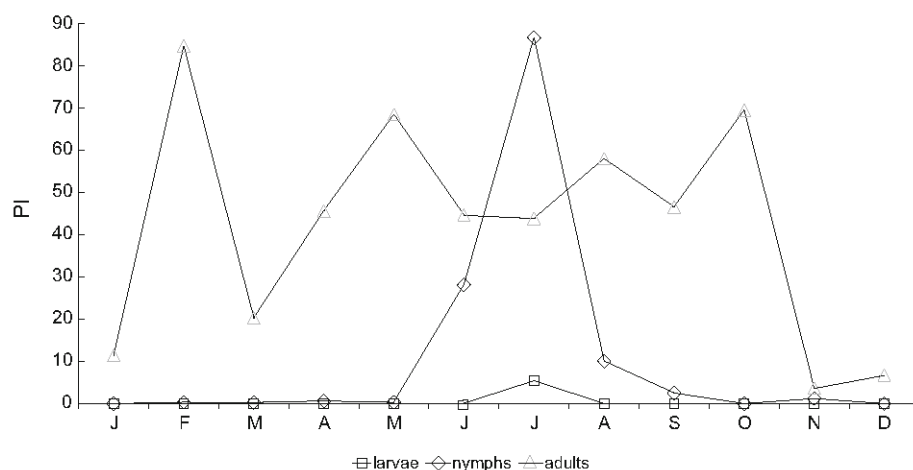


Fig. 4 Mean monthly Parasitization Index (PI) of *Hyalomma lusitanicum* parasitizing red deer in an area from Central Spain area, from January 2007 to December 2014

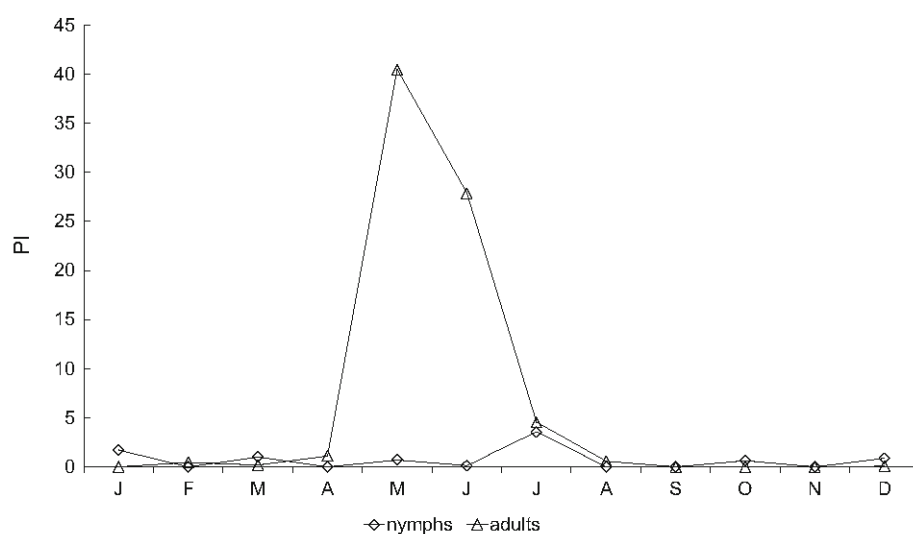


Fig. 5 Mean monthly Parasitization Index (PI) of *Rhipicephalus bursa* parasitizing red deer in an area from Central Spain area, from January 2007 to December 2014

Hyalomma lusitanicum dynamics

The regular presence of this species during the 7 years of the study seems to suggest that it is well adapted to meso-Mediterranean conditions as has been previously indicated (Basco et al. 2008; Barandika et al. 2011). Nevertheless, frequency was much lower than in other studies (Ruiz-Fons et al. 2006; Santos-Silva et al. 2011), probably due to climatic and environmental differences. In this sense, several authors (Gray 2008; Estrada-Peña 2008; Gray et al. 2009; Ruiz-Fons et al. 2013) have reported on the relationship between tick

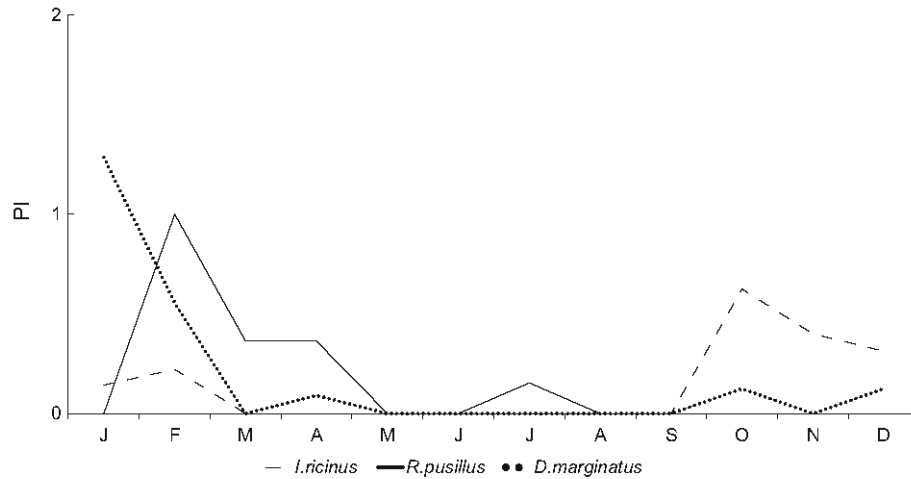


Fig. 6 Mean monthly Parasitization Index (PI) of *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus pusillus* and *Dermacentor marginatus* parasitizing red deer in an area from Central Spain area, from January 2007 to December 2014. Only adults were collected

dynamics and variables such as climate, vegetation or host availability. Although we were able to collect *H. lusitanicum* throughout a wide range of relative humidity (RH) conditions (10–90 %), this species appeared to be most active when RH was under 60 % (Cota 2015; Valcárcel et al. 2015; Requena et al. Submitted). This could explain why in Atlantic areas with high RH the abundance of *H. lusitanicum* is lower while *I. ricinus* is more active (Santos-Silva et al. 2011).

Ruiz-Fons et al. (2006) reported that in this area the red deer is the main host for mature stages of *H. lusitanicum*, whilst immature stages tend to feed on wild rabbit. This explains the abundance of adults and their presence over long periods of time, while all stages (mostly nymphs and adults) were found during the highest Parasitization Index peak observed in July (Fig. 4). This suggests that nymph stages are also able to reach and feed on red deer. Since the abundance of immature stages increases exponentially from late-spring to early-summer (González et al. Submitted), the greatest number of immature stages feeding on red deer is limited to the summer period.

The life cycle of *Hyalomma lusitanicum*

These results, obtained over a period of 7 years, indicate the complex life cycle of *H. lusitanicum* in field conditions. Since we regularly collected engorged females throughout the year, it is reasonable to assume that several different cycles commence at different times in the year. However, according to monthly patterns, apparently the most of them complete their cycles simultaneously during the following year. Besides the influence of climate on tick phenology [for a review, see Gray et al. (2009), Tagliapietra et al. (2011) and Requena et al. (Submitted)], several other factors may influence this complex life cycle: (1) Overlapping of different stages in the field and/or on hosts during the year; (2) Duration of the life cycle; (3) Capacity of adults to overwinter either in the field or on a host; and (4) Reactivation of overwintering adults.

Overlapping of different stages in the field and/or on hosts during the year

It is important to note that we found engorged females every 2–3 months. Therefore, oviposition could occur at least four to six times per year, and different tick stages might temporally coincide several times per year. The regular presence of questing adults supports this conclusion (Valcárcel et al. 2015), like the regular Parasitization Index of red deer by adults observed in this study, and the larva and nymph burdens on primary and secondary hosts, mainly rabbit (González et al. Submitted).

Duration of life cycle

Hyalomma lusitanicum and other *Hyalomma* spp. take from 100 to 200 days to complete the cycle under laboratory conditions, including non-parasitic phases: preoviposition (8 days), oviposition (16 [8–36] days), prefeeding phase of larvae (15 days), larvae feeding (6 [5–7] days), larvae molting (16 [11–22] days) prefeeding phase of nymphs (13 days), nymph feeding (11 [9–13] days), nymph molting (22 [20–24] days) prefeeding phase of adults (20 days), adult feeding and engorgement (17 days) (Ouhelli and Pandey 1984; Ahmed and Kheir 2003; Ahmed et al. 2011; Chen et al. 2009, 2012; Siroky et al. 2011; Cota 2015). Furthermore, recently molted adults recovered in the field spend five or 6 months before being ready to feed on a host, as it has been observed in artificial feeding assays (Kröber and Guerin 2007; Olmeda et al. 2014) and engorged females recovered in November can delay oviposition until February or March (personal observations). So, considering that 94–97 % of the life cycles of ixodid ticks occur off host (Komplen et al. 1996), it must be longer than 1 year under field conditions. In consequence, it is reasonable to expect that only those adults from gravid females that engorged in February are able to reach the adult stage and feed during the same year; i.e. there is probably not enough time for the completed development of ticks that were descended from females that engorged later.

Capacity of adults to winter either in the field or on a host

There is a balanced proportion between sexes of questing *H. lusitanicum* throughout the year, except in colder months when adults remain hidden in the field (Valcárcel et al. 2015). New infestations from spring to autumn are composed of, approximately the same number of males and females. However, while females leave the host after engorgement, the males remain waiting several weeks or months for a new mate (Fawcett et al. 1986); in this study, male ticks were predominant during cold months. A few, both sexes but mainly males of different ages, are able to survive the winter on the host, and other ticks can survive in the field (Valcárcel et al. 2015). Consequently, either in the field or on hosts, adults have the ability to overwinter assuring their survival. Unfortunately we have no data about the likelihood of larvae or nymphs surviving through the winter months.

Reactivation of wintering adults

In the study area, during winter days the temperature usually reaches 15 °C at certain hours (AEMET 2011). It has been reported that *H. lusitanicum* prefers warm temperatures (Cota 2015; Valcárcel et al. 2015); the adults of this tick species actively pursue their host when they feel/see it and need to feed (personal observations, Supp. Video S1). Thus, these short

periods of warm temperatures may be enough to reactivate the oldest wintering adults that are presumably weak and hungry and need to copulate as fast as possible. This could be explained why engorged females can be easily found in February, one of the coldest months of the year. The success rate of this early mating is probably low, but enough to produce a small amount of larvae and the corresponding nymphs that will feed on rabbit in April and June (González et al. Submitted). From March, temperatures rise and RH decrease, reactivating the rest of wintering adults that will progressively infest red deer. The October peak seems to be related to mating behaviour, when red deer cluster, increasing host density and allowing questing ticks to find a suitable host more quickly (Barnard 1991; Estrada-Peña and de la Fuente 2014). This also supports the idea that host movement and density influence tick distribution (Ginsberg et al. 2004; Gilbert 2010).

Other species affecting red deer were in a clear minority in terms of the level of infestation and/or collection period. Although we collected examples of *R. bursa* during the entire year, it was only abundant in the spring. Similarly, as was expected, *R. pusillus* was not abundant and its presence was mostly limited to late winter and spring, very different from the distribution described for this species on its main host, *Oryctolagus cuniculus* (Rodríguez et al. 1981; Márquez 1989). Collection of *D. marginatus* began in the autumn with the highest levels in winter. Its numbers decreased in the spring and it was not present in summer. Lastly, *I. ricinus* appeared suddenly in October, its numbers decreasing progressively during winter and not present in the spring or summer. The low abundance of *I. ricinus* is mainly due to its high dependency on relative humidity that is only present on the highest peaks of the study area. We observed a similar predominance of males versus females throughout the year among *R. pusillus* and *R. bursa*. It has been reported in *R. pusillus* and *Haemaphysalis hispanica* feeding on rabbits (Márquez 1989, 1992) as well in *H. marginatum*, *R. bursa* and *Haemaphysalis choldokovsky* Olenov, 1928, feeding on sheep (Moshaverinia et al. 2012). However an opposite relationship was found in the case of *I. ricinus* and *D. marginatus* feeding on red deer, roe deer and sheep (Kiffner et al. 2010; Moshaverinia et al. 2012). These differences are probably due to dissimilarities in tick phenology and tick-host behaviors that are difficult to compare (Ogden et al. 1998; Randolph 2004).

A number of studies have reported relative preference in terms of attachment site depending on the life stage of the ticks (Márquez and Guiguen 1992; Moshaverinia et al. 2012; Mysterud et al. 2014). This is true for those species where all stages are regularly found on the same host, i.e. *R. pusillus*, *H. hispanica* and *Ixodes* spp, especially in the latter that remain attached 16 h post-mortem (Márquez 1989, 1992; Kiffner et al. 2010; Mysterud et al. 2014). In our study the ticks left their hosts very quickly and we could not systematically test for the attachment site of the different stages and species. Despite finding the two main species over the entire body of the host, we did observe a site preference for adults: *H. lusitanicum* preferred the neck and head whilst *R. bursa* mainly collected around the groin and anal area.

In conclusion, red deer are infested with ticks throughout the entire year. *H. lusitanicum* is the most abundant species and has a complex life cycle in which several generations start their cycle at different times throughout the year and mostly probably need more than 1 year to complete it. Although nymphs typically feed on rabbit, in this study they also showed the ability to feed on ungulates.

Additional studies should focus on questing ticks throughout the year, abundance of immature stages in wild rabbit and the influence of climate and environmental parameters in order to a better understand the phenology of this tick and to design control strategies.

Acknowledgments The authors are especially grateful to his Grace the Duke of Westminster for his support during all the studies. This project was financed by the Villamagna SA and the projects CCG10-UCM/AMB-4936, INCRECYT (European Social Funds) and RTA2014-00080-00-00.

References

- AEMET (Agencia Estatal de Meteorología) (2011) Atlas Climático Ibérico. Ed. AEMET, Catalogo general de Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente y Medio rural y Marino. Madrid, España
- Ahmed AM, Kheir SM (2003) Life cycle and survival of *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Agric Mar Sci* 8:11–14
- Ahmed BM, Taha KM, El Hussein AM (2011) Life cycle of *Hyalomma anatolicum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) fed on rabbits, sheep and goats. *Vet Parasitol* 177:353–358
- Apanaskevich DA, Santos-Silva MM, Horak IG (2008) The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia Parasitol* 55:61–74
- Barandika JF, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Hurtado A, Juste RA, Valcárcel F, Anda P, García-Pérez AL (2011) Differences in questing tick species distribution between atlantic and continental climate regions in Spain. *J Med Entomol* 48:13–19
- Barnard DR (1991) Mechanisms of host-tick contact with special reference to *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in beef cattle forage areas. *J Med Entomol* 28:557–564
- Basco PI, Carballado AD, Cota S, Olmeda AS, Valcárcel F (2008) Estudio de control biológico de garrapatas en la finca “La Garganta”. *Rev Complut Cienc Vet* 2(2):73–84
- Carranza J (1999) Aplicaciones de la etología al manejo de las poblaciones de ciervo del suroeste de la Península Ibérica: producción y conservación. *Etología* 7:5–18
- Carranza J (2011) Ciervo – *Cervus elaphus* Linnaeus, 1758. In: Salvador A, Cassinello J (eds) Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales (Madrid), pp 1–28. <http://www.vertebradosibericos.org>
- Chen Z, Ju Z, Yang J, Zheng H, Liu Z (2009) The life cycle of *Hyalomma asiaticum kozlovi*, Olenov 1931, (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 160:134–137
- Chen Z, Li J, Liu Z, Yang J, Yin H (2012) The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 56:85–92
- Cordero del Campillo M, Castañón Ordóñez L, Reguera Feo A (1994) Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos, Ed. Universidad de León, León
- Cota SC (2015) Control biológico e integrado de la garrapata *Hyalomma lusitanicum* en explotaciones silvo-agro-cinegéticas de ecosistema meso-mediterráneo. Dissertation, Complutense University of Madrid. <http://eprints.ucm.es/29995/>
- Estrada-Peña A (1994) Las garrapatas en España: introducción. Junta de Castilla y León. ISBN: 8478463135, 9788478463138
- Estrada-Peña A (2008) Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res* 103:S87–S95
- Estrada-Peña A, de la Fuente J (2014) The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antivir Res* 108:104–128
- Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibañez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, Romero L, Otero JA (2012) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* 18:179–180
- Fawcett DW, Binnington KC, Voigt WP, Mane SD, Schmidt SP, Essenberg RC, Stone BF, Needham GR, Teel PD, Diehl PA, Connat JL, Dotson E, Ducommun J, Aeschlimann A, Brown SJ, Askenase PW, Barnard DR, Rechav Y, Zeederberg ME, Agbede RIS, Kemp DH, Hoyte HMD, Kocan KM (1986) *The cell biology of the ixodid tick salivary gland*. In: Sauer JR, Hair JA (eds) *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Oklahoma
- García Romero C, Valcárcel F, Corchero JM, Pérez JM, Olmeda AS (2000) Las parasitosis del ciervo en Castilla-La Mancha. *Ecología* 14:235–249
- Gil Collado J, Guillen Lera JL, Zapatero Ramos LM (1979) Claves para la identificación de los Ixodidea españoles (adultos). *Rev Iber Parasitol* 39:107–118

- Gilbert L (2010) Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia* 162:217–225
- Gilbert FF, Dodds DG (1992) The philosophy and practice of wildlife management, 2nd edn. Krieger Publishing Company, Florida
- Ginsberg HS, Zhioua E, Mitra S, Fischer J, Buckley PA, Verret F, Underwood HB, Buckley FG (2004) Woodland type and spatial distribution of nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Environ Entomol* 33:1266–1273
- González J, Valcárcel F, Pérez Sánchez JL, Tercero Jaime JM, Olmeda AS (Submitted) Season dynamics of ixodid ticks on wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from South-Central Spain. *J Med Entomol*
- Gortázar C, Herrero J, Villafuerte R, Marco J (2000) Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain. *Mammalia* 64:411–422
- Gray JS (2008) *Ixodes ricinus* seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *Int J Med Microbiol* 298(supplement 1):19–24
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E (2009) Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009:593232. doi:10.1155/2009/593232
- Habela M, Rol JA, Anton JM, Pena J, Corchero E, van Ham I, Jongejan F (1999) Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia* 41(Suppl 1):47–51
- Kiffner C, Lödige C, Alings M, Vor T, Rühle F (2010) Abundance estimation of *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) on roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp Appl Acarol* 52:73–84
- Komplen JS, Black WC 4th, Keirans JE, Oliver JH Jr (1996) Evolution of ticks. *Ann Rev Entomol* 41:141–161
- Kröber T, Guerin PM (2007) In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends Parasitol* 23:445–449
- Manilla G (1998) Acari: Ixodida (Fauna d'Italia), ed. Calderini. Bologna
- Márquez FJ (1989) Dynamique de la population de *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae) en 1986–1987 dans le sud-est de L'Espagne: Modélisation du cycle biologique. Resultados del muestreo anual de 1986. *Ann Parasitol Hum Comp* 64:374–390
- Márquez FJ (1992) Dynamique de la population de *Haemaphysalis hispanica* (Acarina, Ixodidae) dans le sud-est de L'Espagne. *Vie Milieu* 42:41–49
- Márquez FJ, Guiguen C (1992) Distribution sur l'hôte des ixodides parasites d'*Oryctolagus cuniculus* (L.) et facteurs qui la affectent. *Acarología* 33:141–148
- Moshaverinia A, Dini M, Azizzadeh M (2012) Prevalence of ixodid tick infestation of sheep in the Arasbaran region of Iran. *J Parasit Dis* 36:230–233
- Mysterud A, Hatlegjerde IL, Sørensen J (2014) Attachment site selection of life stages of *Ixodes ricinus* ticks on a main large host in Europe, the red deer (*Cervus elaphus*). *Parasite Vector* 7:510
- Ogden NH, Hailes RS, Nuttall PA (1998) Interstadial variation in the attachment sites of *Ixodes ricinus* ticks on sheep. *Exp Appl Acarol* 22:227–232
- Olmeda AS, Caride E, Mateos A, García Romero C, Corchero J, Valcárcel F (2001) Garrapatas y enfermedades transmitidas en ciervo. *Ovis* 75:37–48
- Olmeda AS, González J, Tercero JM, Aguilar A, Valcárcel F (2014) First in vitro feeding of the tick *Hyalomma lusitanicum*. In: Proceedings of the 13th international congress of parasitology, México. Oral communication 2424
- Ouhelli H, Pandey VS (1984) Development of *Hyalomma lusitanicum* under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 15:57–66
- Pal P, Lewis JW (2004) Parasite aggregations in host populations using a reformulated negative binomial model. *J Helminthol* 78:57–61
- Paull SH, Song S, McClure KM, Sackett LC, Kilpatrick AM, Johnson PTJ (2011) From superspreaders to disease hotspots: linking transmission across hosts and space. *Front Ecol Environ* 10:75–82. doi:10.1890/110111
- Pegram R, Perry B (1986) Ecology and phenology of ticks in Zambia: seasonal dynamics on cattle. *Exp Appl Acarol* 2:25–45
- Perkins SE, Cattadori IM, Tagliapietra V, Rizzoli AP, Hudson PJ (2003) Empirical evidence for key hosts in persistence of a tick-borne disease. *Int J Parasitol* 33:909–917
- Randolph SE (2004) Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 129:S37–S65
- Requena F, Cabrero-Sañudo F, Olmeda-García AS, González J, Valcárcel F (Submitted) Influence of environmental temperature and humidity on free-living stages of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in Ciudad Real, Spain. *J Med Entomol*
- Rodríguez JA, Zapatero Ramos LM, Sánchez Covisa A (1981) Valoración estacional de Ixodidae y Siphonaptera de lepidóridos de Ciudad Real. *Rev Iber Parasitol* 41:527–538

- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P, Höfle U, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C (2006) Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol* 140:133–142
- Ruiz-Fons F, Acevedo P, Sobrino R, Vicente J, Fierro Y, Fernández-de-Mera IG (2013) Sex-biased differences in the effects of host individual, host population and environmental traits driving tick parasitism in red deer. *Front Cell Infect Microbiol* 3:23. doi:10.3389/fcimb.2013.00023
- Santos-Silva MM, Beati L, Santos AS, De Sousa R, Nuncio MS, Melo P, Santos-Reis M, Fonseca C, Formosinho P, Vilela C, Bacellar F (2011) The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol* 55:85–121. doi:10.1007/s10493-011-9440-x (epub 2011 Mar 31)
- Shaw DJ, Dobson AP (1995) Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. *Parasitol* 111:S111–S133
- Siroky P, Erhart J, Petrzalkova KJ, Kamler M (2011) Life cycle of tortoise tick *Hyalomma aegyptium* under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 54:277–284
- Tagliapietra V, Rosà R, Arnoldi D, Cagnacci F, Capelli G, Montarsi F, Hauße HC, Rizzoli A (2011) Saturation deficit and deer density affect questing activity and local abundance of *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) in Italy. *Vet Parasitol* 183:114–124
- Toledo A (2007) Dinámica de la infección de garrapatas por agentes zoonóticos en la zona centro de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. <http://eprints.ucm.es/29995/1/T36038.pdf>
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcárcel F, Casado-Nistal MA, Rodríguez-Vargas M, Gil H, Anda P (2009) Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg* 81:67–74
- Valcárcel F, Pérez JL, Tercero JM, Basco-Basco PI, Cota S, Cutuli MT, Martín-Hernández R, Olmeda AS (2014) Control of host-seeking adults of *Hyalomma lusitanicum* with oxalic acid under field conditions. *IJVMR* Vol. 2014. Article ID 871622. doi:10.5171/2014.871622 (the reference seems somewhat strange)
- Valcárcel F, González J, Pérez Sánchez JL, Tercero Jaime JM, Olmeda AS (2015) Long-term ecological study of host-seeking adults of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean climate. *J Med Entomol*. doi:10.1093/jme/tjv152
- Wobeser GA (1994) Investigation and management of disease in wild animals. Plenum Press, New York



Seasonal dynamics of ixodid ticks on wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae) from Central Spain

J. González¹ · F. Valcárcel² · J. L. Pérez-Sánchez^{1,3} ·
J. M. Tercero-Jaime¹ · A. S. Olmeda³

Received: 14 March 2016 / Accepted: 5 July 2016 / Published online: 13 July 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract Rabbit Hemorrhagic Disease and Myxomatosis caused a decline in the rabbit population in the second half of the last century. Despite some recovery, the risk of vector-borne disease is present and thus the importance of controlling vector populations. In the current study, we describe the ixodid tick fauna in wild rabbit in a natural reserve in Ciudad Real (Central Spain) during the course of two 3-year periods (2007–2009 and 2012–2014). Of all the ticks collected on average 72.5 % were larvae, 24.4 % nymphs and 3.1 % adults, although the percentage varied monthly. Seven tick species were identified: *Hyalomma lusitanicum* Koch (Parasitic indicator [PI] = number of ticks per examined rabbit = 96.47), *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado (PI = 47.37), *Haemaphysalis hispanica* Gil Collado (PI = 12.15), *Ixodes ventalloi* Gil Collado (PI = 0.65), *R. bursa* Canestrini and Fanzago (PI = 0.18), *R. sanguineus* Latreille (PI = 0.11), *Dermacentor marginatus* Sulzer (PI = 0.01). In spring and summer, most abundant were larvae of *H. lusitanicum*, followed by immature stages of *R. pusillus* and *Ha. hispanica*. In autumn, the main tick species were nymphs of *I. ventalloi* whereas in winter adults of *Ha. hispanica* were more numerous. *Rhipicephalus pusillus* was present all year long, although not always in high percentage. PI of other species (*R. bursa*, *R. sanguineus* and *D. marginatus*) were too low to be representative. The seasonal dynamics of ticks on wild rabbit defined in this study could be useful to design species-specific control strategies.

Keywords Wild rabbits · Tick · meso-Mediterranean · Seasonal dynamics

✉ F. Valcárcel
valcarcel.felix@inia.es

¹ Villamagna SA, Finca “La Garganta”, 14.440 Villanueva de Córdoba, Córdoba, Spain

² Grupo de Parasitología Animal, Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnologías Agraria y Alimentaria (INIA), 28040 Madrid, Spain

³ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Introduction

Wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is an integral part of meso-Mediterranean ecosystems (Delibes-Mateos et al. 2007). In the Iberian Peninsula, it is vital to the food chain of endangered predators (Soriguer 1980a) and is also important as a hunting species (Virgós et al. 2007). Nevertheless, the balance of these ecosystems is disrupted by diseases like Rabbit Hemorrhagic Disease (RHD) or Myxomatosis (Rogers et al. 1994; Calvete 1999). In Spain, these diseases caused a 71 % decline in the rabbit population between 1973 and 1993 (Virgós et al. 2007) and despite a slight increase of population in recent years, the risk of vector-borne diseases remains present. It is therefore important to study the population dynamics of their ectoparasites to be able to successfully control them.

The structure of ixodid tick fauna on *O. cuniculus* has been studied in France (Gilot et al. 1985) and the Iberian Peninsula (Soriguer 1980b; Rodríguez 1980; Rodríguez et al. 1981; Márquez 1993). Three tick species were commonly founded on wild rabbits: *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, *Haemaphysalis hispanica* Gil Collado, and *Ixodes ventralloi* Gil Collado; in addition, immature stages of other tick species could feed on, like *Dermacentor marginatus* Sulzer, *Hyalomma lusitanicum* Koch and *I. ricinus* L. The phenology and host distribution patterns of these parasites are different (Márquez and Guiguen 1992) and are also determined by exophilic and endophilic/nidicolous behaviors (Sobrino et al. 2012). Life cycles of *R. pusillus* and *Ha. hispanica* have a similar activity period, during spring and summer (Rodríguez et al. 1981; Márquez 1989, 1992), while *I. ventralloi* is more active in the winter (Márquez 1990); however, all are typically located in burrows (endophilic ticks). Conversely, *D. marginatus*, *I. ricinus* and *H. lusitanicum* are exophilic ticks, the latter being one of the most abundant exophilic ticks in the Central Iberian Peninsula (Basco et al. 2008; Barandika et al. 2011) with marked host-seeking questing activity (Valcárcel et al. 2015a).

The high density of potential host species such as wild rabbit could contribute to an increase in the tick population in common habitats causing a health risk to humans and other animals (Gortazar et al. 2014). *H. lusitanicum* is vector of *Theileria annulata* (Viseras et al. 1999); also under molecular techniques it was detected the presence on this tick species of several zoonotic pathogens such as *Coxiella burnetii* (Toledo et al. 2009), Crimean Congo virus (Estrada et al. 2012). Similarly, the presence of *Francisella tularensis* have recently demonstrated in several tick species in lagomorphs in Portugal (Lopes de Carvalho et al. 2016).

The specific control measures against a tick species has been demonstrated as a useful tool to control tick infection on free wild rabbits (Valcárcel et al. 2015b). In order to support the design of suitable control measures, the purpose of this study is to define the seasonal dynamic of ixodid ticks on wild rabbits in a meso-Mediterranean area in Central Spain.

Materials and methods

Study area

The study was carried out in a private nature reserve in Ciudad Real (Central Spain: 37°24'78"N 42°59'101"E), a representative zone of the meso-Mediterranean bioclimatic environment. According to the Köppen classification, the climate is Csa (temperate with

dry or hot summers) (AEMET 2011, 2015). The site covers an area of 13,000 ha at an altitude between 500 and 1266 m above sea level; annual average rainfall is 650 mm and temperatures range from -4 to 43 °C. The forest is mainly comprised of oaks (*Quercus ilex* L.), cork (*Quercus suber* L.), mastic (*Pistacia lentiscus* L.), eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) and pine (*Pinus pinea* L. and *P. pinaster* Aiton). There is also limited farming activity: 265 ha of organically grown olive (*Olea europea* L.), 1300 ha of cereals and aromatic and native shrub species. It is a refuge for threatens species such as the Imperial eagle (*Aquila adalberti* C. L. Brehm) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus* Temminck), and many other species such as the Golden eagle (*Aquila chrysaetos* L.) and the Peregrine falcon (*Falco peregrinus*, L.), and besides, owls (*Bubo bubo*, L.), black stork (*Ciconia nigra*), black vulture (*Aegypius monachus* Savigny), red fox (*Vulpes vulpes* L.), red deer (*Cervus elaphus* L.), roe deer (*Capreolus capreolus* L.), wild boar (*Sus scrofa* L.), partridge (*Alectoris rufa* L.), wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.), hare (*Lepus europaeus* L.) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus* L.).

Temperature and relative humidity (Fig. 1) were previously measured by a hand-held thermo-hygrometer in a parallel study during the same period (Valcárcel et al. 2015a).

Tick sampling

We collected data on tick activity on wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) during two 3-year periods: 2007–2009 and 2012–2014. The animals were regularly culled (12–13 wild rabbits per month) to recover the ticks feeding on them. Rabbits were hung upside down over a bucket filled with water for 24 h at room temperature in order to allow the ticks to detach from the host and fall into the water. That water was then filtered through gauze to recover the ticks.

Tick identification

Specimens were kept in 70 % alcohol for classification in the laboratory. We used specific keys to identify different stages (Hoogstraal and Morel 1970; Gil-Collado et al. 1979; Manilla 1998; Estrada-Peña et al. 2004a; Apanaskevich et al. 2008).

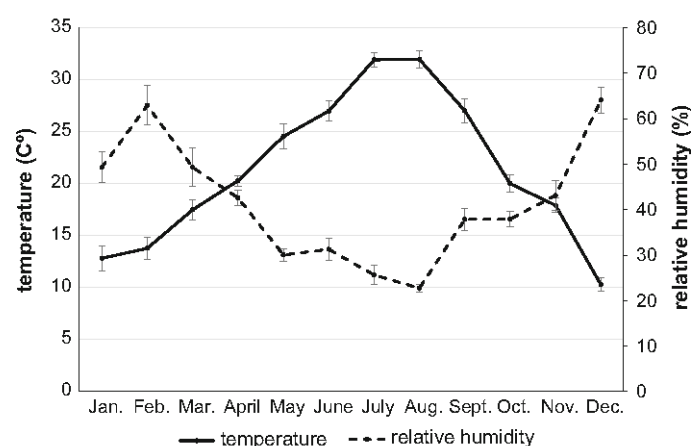


Fig. 1 Mean monthly temperature and relative humidity during the 6 years of study in a meso-Mediterranean area (previously collected data: Valcárcel et al. 2015a)

Statistical analysis

We utilized the IBM® SPSS® Statistics 20 software (SPSS 2011). Sampling from population were not normally distributed and variances were not homogeneous, in consequence we performed the Kruskal–Wallis H nonparametric test ($\alpha = 0.05$) to compare the tick infestation through the years and monthly, and a post hoc multiple comparison test ($\alpha = 0.05$). Moreover, we defined the descriptive biology of each tick species with a Parasitic Indicator (PI) expressed as the abundance: number of ticks per number of examined animals (Margolis et al. 1982).

Results

A total number of 143,283 ticks were collected from 913 wild rabbits along the study; there were not statistically significant differences between the 6 years ($H = 10.19$; $df = 5$; $P > 0.05$). However, the tick burden on wild rabbits differed significantly between seasons ($H = 631.55$; $df = 3$; $P < 0.0001$). It was registered the data of temperature and relative humidity monthly each year, which followed a similar fluctuation typical of the study area (Fig. 1).

Seven tick species were identified: *Hyalomma lusitanicum* (PI = 96.47), *Rhipicephalus pusillus* (PI = 47.37), *Haemaphysalis hispanica* (PI = 12.15), *Ixodes ventralloi* (PI = 0.65), *R. bursa* (PI = 0.18), *R. sanguineus* (PI = 0.11), *Dermacentor marginatus* (PI = 0.01). Each one presented a different seasonal dynamics (Table 1): winter (begins on December 22), spring (begins on March 21), summer (begins on June 21) and autumn (begins on September 22). In spring and summer the most abundant tick was *H. lusitanicum*, but in autumn *I. ventralloi* was the most abundant, and in winter *Ha. hispanica* was more prevalent. *R. pusillus* was present during all months but at a minor intensity, while the percentage of abundance from other species were too low to determine seasonality (Fig. 2).

Overall, the ixodid tick fauna was composed by 72.49 % of larvae, 24.40 % of nymphs and 3.11 % of adults, although the percentage varied significantly depending on the seasons (larvae $H = 620.43$; $df = 3$; $P < 0.0001$; nymphs $H = 551.33$; $df = 3$; $P < 0.0001$;

Table 1 Monthly percentage of tick species collected on wild rabbit during a 6 year study in a meso-Mediterranean area

Table 1 Monthly percentage of tick species collected on wild rabbit during a 6 year study in a meso-Mediterranean area	%	<i>H. l</i>	<i>R. p</i>	<i>Ha. h</i>	<i>I. v</i>	<i>R. b</i>	<i>R. s</i>	<i>D. m</i>
The highest percentage of each month appears in bold: <i>H. l</i> , <i>Hyalomma lusitanicum</i> ; <i>R. p</i> , <i>Rhipicephalus pusillus</i> ; <i>Ha. h</i> , <i>Haemaphysalis hispanica</i> ; <i>I. v</i> , <i>Ixodes ventalloi</i> ; <i>R. b</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i> ; <i>R. s</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ; and <i>D. m</i> , <i>Dermacentor marginatus</i>	Jan.	3.19	7.71	84.04	5.05	0	0	0
	Feb.	6.76	16.82	75.53	0.75	0.15	0	0
	Mar.	6.62	38.06	55.00	0.08	0.16	0.08	0
	April	61.42	22.56	16.02	0	0	0	0
	May	56.90	31.46	3.86	6.92	0.50	0.32	0.04
	June	71.17	22.54	5.95	0.07	0.10	0.18	0
	July	57.72	36.31	5.80	0.01	0.12	0.04	0
	Aug.	82.46	8.04	9.42	0	0.01	0.07	0
	Sept.	46.98	19.44	32.33	0.94	0.04	0.27	0
	Oct.	15.32	17.12	12.16	53.60	1.35	0	0.45
	Nov.	16.98	7.55	3.77	71.70	0	0	0
	Dec.	28.07	10.53	17.54	43.86	0	0	0

The highest percentage of each month appears in bold: *H. l.*, *Hyalomma lusitanicum*; *R. p.*, *Rhipicephalus pusillus*; *Ha. h.*, *Haemaphysalis hispanica*; *I. v.*, *Ixodes ventralloi*; *R. b.*, *Rhipicephalus bursa*; *R. s.*, *Rhipicephalus sanguineus*; and *D. m.*, *Dermacentor marginatus*

Fig. 2 Overall percentage (%) of each tick species collected on wild rabbit during a 6 year study in a meso-Mediterranean area

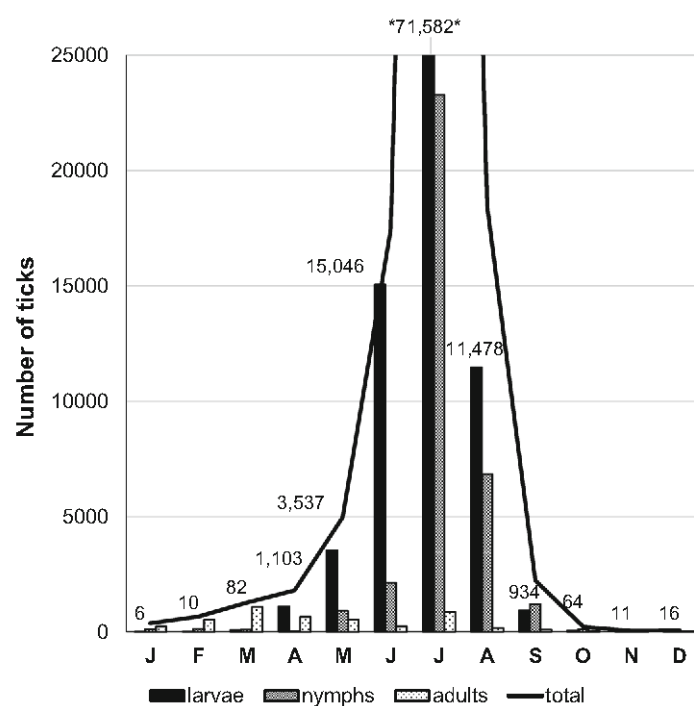
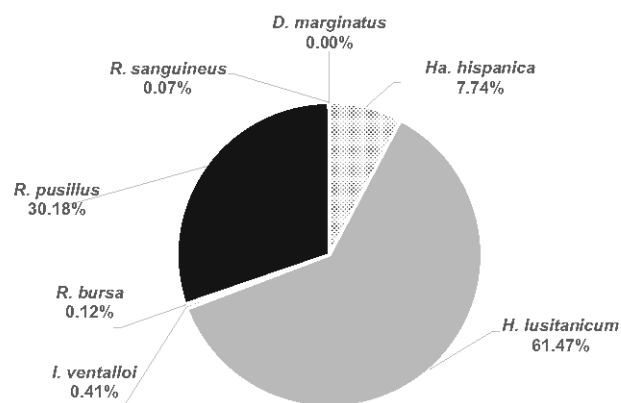


Fig. 3 Monthly number of each life stage (larva, nymph, adult) of ticks collected on wild rabbit during the six years of study in a meso-Mediterranean area

adults $H = 392.29$; $df = 3$; $P < 0.0001$) (Fig. 3), and each tick species (Table 2). We collected all life stages of each tick species, except for *R. bursa* and *R. sanguineus* (all adults) and *D. marginatus* (all at immature stages).

Hyalomma lusitanicum

The PI showed a spring-summer pattern (Fig. 4). The presence of adults on rabbits, specifically females, was minor than immature stages and practically limited to the summer

Table 2 Results of the post hoc multiple comparison non-parametric tests of the four tick species more abundant, collected on wild rabbit during a 6 year study in a meso-Mediterranean area

Average range	Winter	Spring	Summer	Autumn
<i>Hyalomma lusitanicum</i>				
Total	222.84 ^a	443.18 ^b	711.72 ^c	299.69 ^d
Larvae	244.73 ^a	451.70 ^b	694.36 ^c	300.00 ^a
Nymphs	264.29 ^a	387.92 ^b	701.20 ^c	329.50 ^{a,b}
Adults	408.04 ^a	426.01 ^a	535.18 ^b	414.46 ^a
Males	451.20 ^a	453.16 ^a	467.55 ^a	450.41 ^a
Females	412.00 ^a	428.05 ^a	528.17 ^b	419.18 ^a
<i>Rhipicephalus pusillus</i>				
Total	329.31 ^a	470.97 ^b	697.39 ^c	220.55 ^d
Larvae	292.00 ^a	381.36 ^b	692.55 ^c	326.65 ^{a,b}
Nymphs	287.10 ^a	309.37 ^{a,b}	718.30 ^c	354.71 ^{a,b}
Adults	514.77 ^a	645.13 ^b	455.95 ^a	263.46 ^c
Males	524.67 ^a	624.91 ^b	442.81 ^c	288.28 ^d
Females	489.44 ^a	586.94 ^b	457.56 ^a	326.90 ^c
<i>Haemaphysalis hispanica</i>				
Total	541.65 ^a	454.73 ^b	564.08 ^{a,c}	258.73 ^d
Larvae	331.59 ^a	350.53 ^{a,b}	653.24 ^c	375.51 ^{a,b}
Nymphs	481.13 ^a	428.35 ^{a,b}	492.45 ^{a,c}	416.97 ^{a,b}
Adults	700.05 ^a	620.21 ^b	334.22 ^c	312.67 ^{c,d}
Males	686.09 ^a	604.38 ^b	337.04 ^c	331.79 ^c
Females	615.23 ^a	557.45 ^a	381.22 ^b	362.34 ^b
<i>Ixodes ventralloi</i>				
Total	436.76 ^a	465.32 ^{a,b,c}	411.05 ^{a,c}	524.70 ^b
Larvae	430.62 ^a	501.81 ^a	448.06 ^a	450.63 ^a
Nymphs	461.37 ^a	418.27 ^{a,b}	424.66 ^{a,b}	528.04 ^a
Adults	454.12 ^a	446.0 ^a	446.0 ^a	482.46 ^a
Males	454.21 ^a	451.50 ^a	451.50 ^a	470.68 ^a
Females	456.43 ^a	451.00 ^a	451.00 ^a	470.18 ^a

It was calculated for the total, each life stages (larvae, nymphs, adults) and specifically on males and females

Superscripts (a, b, c, d) indicate group significantly differences ($P < 0.05$) based on post hoc tests. Winter ($n = 168$ wild rabbits), spring ($n = 195$), summer ($n = 312$) and autumn ($n = 238$)

season (Table 2). Larvae slowly started to appear in spring with infestation increasing intensely during summer. After that, PI declined swiftly with low numbers and almost disappearing in winter. Nymphs emerged in spring, approximately 1 month later than the larval stage, the population increasing from that point to the maximum numbers reached in summer, with lower levels than larvae. A swift decline was then observed in autumn and only slight presence in the last months, aside from larvae.

Rhipicephalus pusillus

This was the second most representative tick species on wild rabbit. Adults started to appear in winter and reached peak numbers in spring, then declined during the summer when the population stabilized at lower levels, adults then decreasing in autumn (Fig. 5). Both sexes exhibited a similar spring pattern, the abundance of males being higher than females, except in summer; that season coincided with the biggest infestation of larvae observed, and consequently nymphs. Immature stages started to emerge slowly in spring, reaching a peak in summer and detaching themselves from rabbits in the autumn (Table 2).

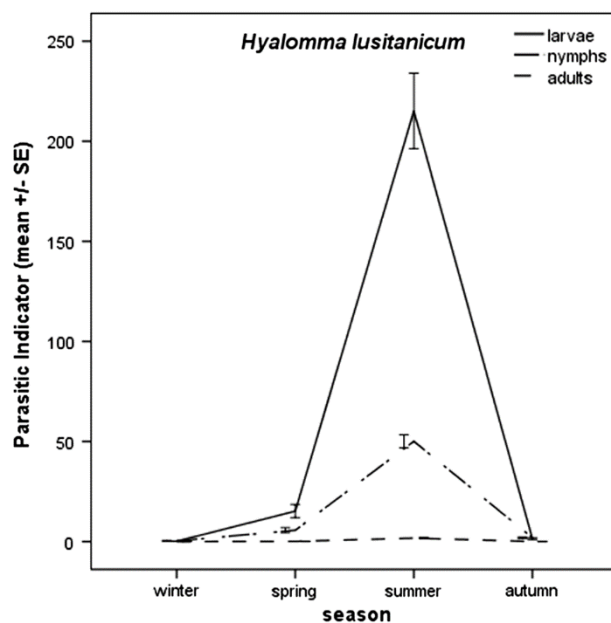
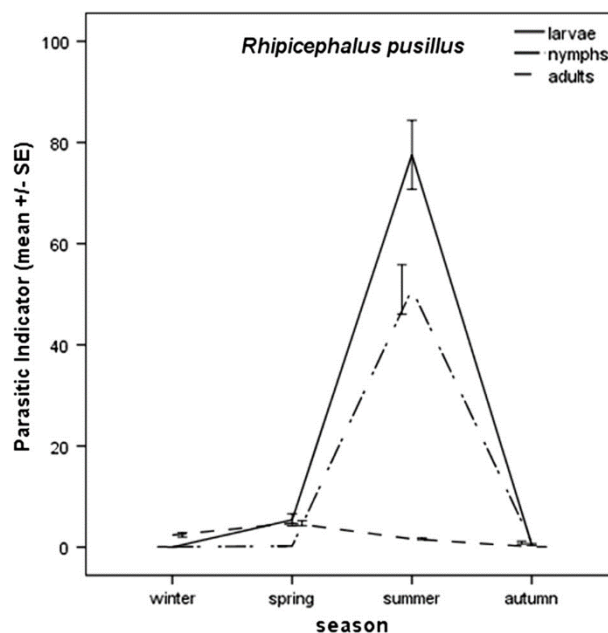


Fig. 4 Monthly Parasitic Indicator (PI) dynamics of *Hyalomma lusitanicum* ticks collected on wild rabbit in a meso-Mediterranean area classified by life stage (larvae ____, nymphs __ . __, adults __ _)

Fig. 5 Monthly Parasitic Indicator (PI) dynamics of *Rhipicephalus pusillus* ticks collected on wild rabbit in a meso-Mediterranean area classified by life stage (larvae ____, nymphs __ . __, adults __ _)



Haemaphysalis hispanica

The parasitic cycle of this tick species is similar to *R. pusillus* (Fig. 6). Adult infestation was prevalent from winter and spring followed by emerging larvae during summer, and nymphs later (Table 2).

Ixodes ventralloi

The PI of this species exhibited a different pattern (Fig. 7) than the previous tick species. Adults attached to wild rabbits in autumn and larvae did not fix on rabbits until the following spring (PI peak observed). Nymphs began to develop from summer on, the latter reaching their peak in autumn and enduring nearly the entire winter (Table 2).

Discussion

The structure of ixodid tick fauna on the wild rabbits in our study is similar to that already described by Rodríguez (1980). Rabbits were mainly infested by all stages of four tick species throughout the year: *H. lusitanicum*, *R. pusillus*, *Ha. hispanica* and *I. ventralloi*, and

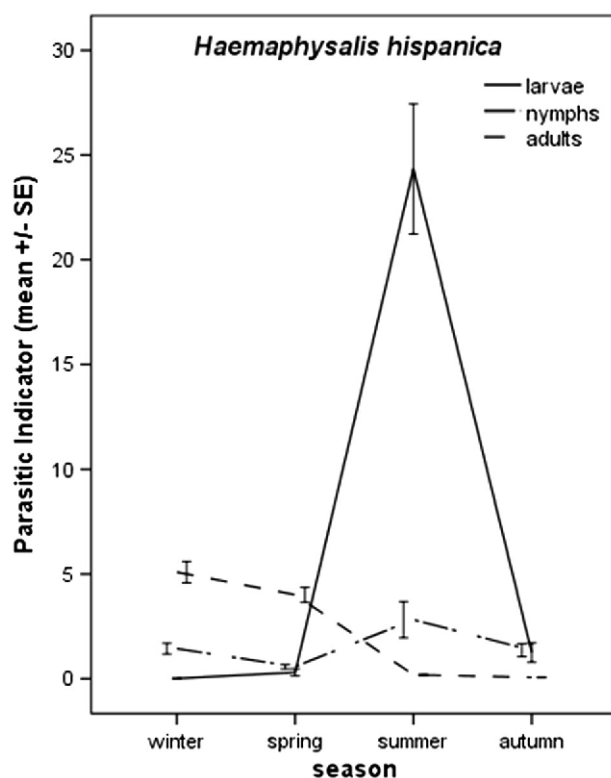


Fig. 6 Monthly Parasitic Indicator (PI) dynamic of *Haemaphysalis hispanica* ticks collected on wild rabbit in a meso-Mediterranean area classified by life stage (larvae ____, nymphs __ . __, adults __)

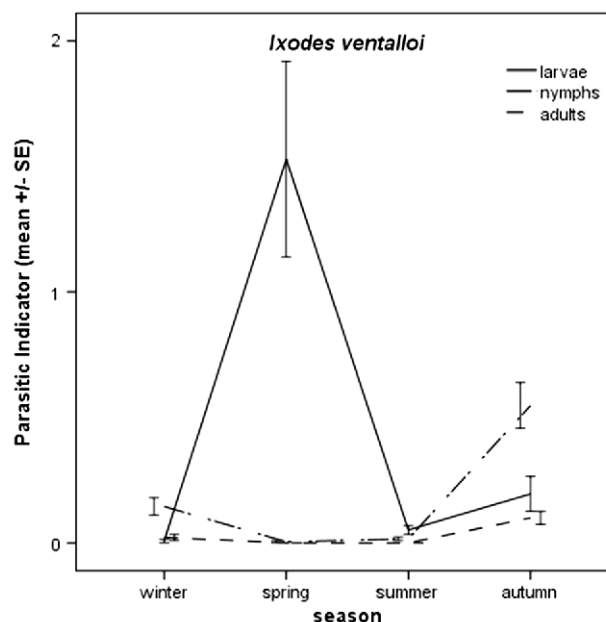


Fig. 7 Monthly Parasitic Indicator (PI) dynamics of *Ixodes ventralloi* ticks collected on wild rabbit in a meso-Mediterranean area classified by life stage (larvae —, nymphs — · —, adults - -)

occasionally by immature stages of *D. marginatus* or adults of *R. bursa* and *R. sanguineus*. It was observed a spring-summer pattern throughout the study established mainly by larvae and nymphs.

The most prevalent species was *H. lusitanicum* as previously reported in the present study area (Basco et al. 2008). Larvae and nymphs fed on wild rabbit from late spring to early summer while adults habitually sought wild ungulates as hosts (Apanaskevich et al. 2008). Thus, the majority of *H. lusitanicum* ticks collected were at immature stages of development. It appears that most satiated larvae detach themselves from wild rabbits inside or near burrows and then molt rapidly into nymphs since they can also feed on the same host just 1 month after larval infestation. A slight proportion of immature stages may detach themselves in the open field where they could reattach to calves for feeding. The complexity of this three-host cycle, with overlapping life stages in the same host and habitat (unpublished data) joined their survival under a wide range of temperatures and humidity levels (Valcárcel et al. 2015a), suggest the difficult to control this tick species.

All stages of *R. pusillus* feed mainly on wild rabbit but can be found attached to other animals sharing the same habitat (Ruiz-Fons et al. 2006; Millán et al. 2007; Sobrino et al. 2012). The dynamics of larvae and nymphs was similar to *H. lusitanicum* during the spring and summer. Márquez and Jiménez Millán (1988) associated this peak of immature stages with the elevated birth rate of rabbits and the high temperatures. Male ticks remain for long periods of time on the host and take multiple blood meals, such as *R. sanguineus* (Dantas-Torres 2010).

Haemaphysalis hispanica has been considered more endophilic than *R. pusillus* (Gilot et al. 1985); although their dynamic patterns were similar, adults of *Ha. hispanica* were more abundant in winter. PI was related to the living conditions of wild rabbits, since ticks find a convenient source of blood in burrows (Daniel and Dusbábek 1994).

Ixodes ventralloi appears to be specific to wild rabbit but with a different dynamic from the other species. Its pattern is autumn-based because of its need for higher humidity levels to complete the life cycle, similar to other ticks such as *I. ricinus* (Estrada-Peña et al. 2004b). We observed a lower PI than Rodríguez (1980) which could be due to warmer winter temperatures during our study. It has been described that *I. ventralloi* nymphs feed on rabbit, but larvae can also feed on other small mammals (Arthur 1963 cited by Gilot et al. 1985). This could be an autumn/winter survival tactic (Márquez 1990) used by this species when the density of wild rabbits periodically descends due to disease Myxomatosis (Calvete 1999).

The minority species, *R. bursa*, *R. sanguineus* and *D. marginatus*, may exploit the dormancy (diapause) mechanisms of other tick species to emerge and attach to wild rabbits. However, PI were insufficient to describe their phenology.

In conclusion, the seasonal dynamics of ticks on wild rabbits in meso-Mediterranean areas are dominated by four species which do not simultaneously infect their host. Even though *R. pusillus* infected rabbit nearly the entire year, it was not the main species. In spring and summer, the most abundant tick species was *H. lusitanicum* followed by *R. pusillus* and *Ha. hispanica*; *I. ventralloi* ticks were more frequent in autumn and *Ha. hispanica* predominated in winter. Therefore, these data clearly indicate that it is impossible to control all tick species simultaneously, and each species needs an individual strategic measure. Additional studies should be performed in each area to determine the tick species to control and then, the specific measure to apply.

Acknowledgments The authors are especially grateful to his Grace the Duke of Westminster, for his support during all the studies. This project was financed by the Villamagna SA and the Projects CCG10-UCM/AMB-4936, INCRECYT (European Social Funds) and RTA2014-00080-00-00.

References

- Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) (2011) Atlas climático ibérico. Catálogo general de Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente y Medio rural y Marino. AEMET, Madrid
- Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) (2015) Valores climatológicos normales. <http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclima246tologicos?l=4121&k=clm>
- Apanaskevich DA, Santos-Silva MM, Horak IG (2008) The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia Parasitol (Praha)* 55:61–74
- Barandika JF, Olmeda SA, Casado-Nistal MA, Hurtado A, Juste RA, Valcárcel F, Anda P, García-Pérez AL (2011) Differences in questing tick species distribution between Atlantic and Continental climate regions in Spain. *J Med Entomol* 48:13–19
- Basco PB, Álvaro AC, Guajardo SC, García AO, Sancho FV (2008) Estudio de control biológico de garrapatas en la finca “La Garganta”. *Rev Complut Cienc Vet* 2:73–84
- Calvete C (1999) Epidemiología de la Enfermedad Hemorrágica (VHD) y Mixomatosis en el Conejo Silvestre (*Oryctolagus cuniculus* L. 1758) en el valle medio del Ebro: Modelización de VHD y Herramientas de Gestión. Ph.D. dissertation, University of Zaragoza, Zaragoza
- Daniel M, Dusbábek F (1994) Micrometeorological and microhabitat factors affecting maintenance and dissemination of tick-borne diseases in the environment. In: Sonenshine DE, Mather TN (eds) *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Oxford University Press, NY, pp 91–138
- Dantas-Torres F (2010) Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors* 3:1–11
- Delibes-Mateos M, Redpath SM, Angulo E, Ferreras P, Villafuerte R (2007) Rabbits as a keystone species in southern Europe. *Biol Conserv* 137:149–156
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR (2004a) Ticks of domestic animals in the mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Zaragoza

- Estrada-Peña A, Martínez JM, Sanchez Acedo C, Quilez J, Del Cacho E (2004b) Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med Vet Entomol* 18:387–397
- Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, Sánchez N, Habela MA, Portillo A, Romero L, Oteo JA (2012) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* 18:179–180
- Gil-Collado J, Guillén JL, Zapatero LM (1979) Claves para la Identificación de los Ixodoidea Españoles (Adultos). *Rev Ibérica Parasitol* 39:107–118
- Gilot B, Rogers P, Lachet B (1985) Données Biologiques et Écologiques sur les Tiques de Lagomorphes (et plus spécialement celles du Lapin de Garenne, *Oryctolagus cuniculus* L.) dans les Alpes Françaises et leur Avant-Pays. *Acarologia* 26:335–354
- Gortazar C, Reperant LA, Kuiken T, de la Fuente J, Boadella M, Martínez-Lopez B, Ruiz-Fons F, Estrada-Peña A, Drostén C, Medley G, Ostfeld R, Peterson T, VerCauteren KC, Menge C, Artois M, Schultsz C, Delahay R, Serra-Cobo J, Poulin R, Keck F, Aguirre AA, Henttonen H, Dobson AP, Kutz S, Lubroth J, Mysterud A (2014) Crossing the interspecies barrier: opening the door to zoonotic pathogens. *PLoS Pathog* 10(6):1–5
- Hoogstraal H, Morel PC (1970) *Haemaphysalis (Rhipistoma) hispanica* Gil Collado, a parasite of the European rabbit, redescription of adults, and description of immature stages (Ixodoidea: Ixodidae). *J Parasitol* 56:813–822
- Lopes de Carvalho I, Petersen JM, Anda P, Nuncio MS, Escudero R, Toledo A, Carvalho CL, Barandika JF, Respcio-Kingry LB, Garcia-Amil C, García-Pérez AL, Olmeda AS, Zé-Zé L (2016) *Francisella* species in ticks and animals. Iberian Peninsula. *Ticks Tick-borne Dis* 7(1):159–165. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.10.009
- Manilla G (1998) Fauna d'Italia. Acari: Ixodida. Calderini, Bologna
- Margolis L, Esch GW, Holmes JC, Kuris AM, Schad GA (1982) The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *J Parasitol* 68:131–133
- Márquez FJ (1989) Dynamique de la population de *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae) en 1986–1987 dans le sud-est de l'Espagne: Modélisation du Cycle Biologique. *Ann Parasitol Hum Comp* 64:374–390
- Márquez FJ (1990) Dinámica de la población de *Ixodes ventralis* Gil Collado, 1936 (Acarina, Ixodidae) durante 1986–1987 en el sureste de España. *Rev Ibérica Parasitol* 50:101–116
- Márquez FJ (1992) Dynamique de la population de *Haemaphysalis hispanica* (Acarina, Ixodidae) dans le sud-est de l'Espagne. *Vie Milieu* 42:41–49
- Márquez FJ (1993) Chronological structure of the Ixodidae parasitocenosis of *Oryctolagus cuniculus* (L., 1758) (Lagomorpha: Leporidae) in a prospected area in the southeast of the Iberian Peninsula. *Res Rev Parasitol* 53:47–52
- Márquez FJ, Guiguen C (1992) Distribution sur l'hôte des Ixodidae parasites d'*Oryctolagus cuniculus* (L.) et facteurs qui l'affectent. *Acarologia* 33:141–148
- Márquez FJ, Jiménez Millán F (1988) Hacia un modelo de ciclo biológico de *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae). Resultados del muestreo anual de 1986. *Rev Ibérica Parasitol* 48:433–443
- Millán J, Ruiz-Fons F, Márquez FJ, Viota M, López-Bao J, Martín-Mateo MP (2007) Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores in Spain. *Med Vet Entomol* 308(21):248–254
- Rodríguez JA (1980) Estudio de Ectoparásitos de Lepóridos de la provincia de Ciudad Real. Ph.D. dissertation, Complutense University of Madrid, Madrid
- Rodríguez JA, Zapatero LM, Sánchez-Covisa A (1981) Variación estacional de Ixodidae y Siphonaptera de la provincia de Ciudad Real. *Rev Ibérica Parasitol* 41:527–538
- Rogers PM, Arthur CP, Soriguer RC (1994) The rabbit in continental Europe. In: Thompson HV, King CM (eds) *The European rabbit: the history and biology of a successful colonizer*. Oxford University Press, Oxford, pp 22–63
- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P, Höfle U, Vicente J, de la Fuente J, Gortazar C (2006) Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol* 140:133–142
- Sobrino R, Millán J, Oleaga A, Gortazar C, de la Fuente J, Ruiz-Fons F (2012) Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol* 184:248–257
- Soriguer RC (1980a) El conejo, *Oryctolagus cuniculus* (L.), en Andalucía Occidental: Parámetros corporales y curva de crecimiento. *Doñana Acta Vertebr* 7:83–90
- Soriguer RC (1980b) Ciclo Anual de Parasitismo por Pulgas y Garrapatas en el Conejo de Campo (*Oryctolagus cuniculus* L.) en Andalucía Occidental, España. *Rev Ibérica Parasitol* 40:539–550

- SPSS Inc. (2011) IBM SPSS statistics 20. IBM Company, Armonk
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcárcel F, Casado-Nistal MA, Rodríguez-Vargas M, Gil H, Anda P (2009) Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg* 81(1):67–74
- Valcárcel F, González J, Pérez-Sánchez JL, Tercero-Jaime JM, Olmeda AS (2015a) Long-term ecological study of host-seeking adults of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a meso-mediterranean climate. *J Med Entomol*. doi:[10.1093/jme/tjv152](https://doi.org/10.1093/jme/tjv152)
- Valcárcel F, Pérez-Sánchez JL, Tercero-Jaime JM, Basco-Basco PI, Guajardo SC, Cutuli MT, González J, Olmeda AS (2015b) Control of tick infestations in *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) with spinosad under laboratory and field conditions. *J Med Entomol* 52:207–213
- Virgós E, Cabezas-Díaz S, Lozano J (2007) Is the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) a threatened species in Spain? Sociological constraints in the conservation of species. *Biodivers Conserv* 16:3489–3504
- Viseras J, Hueli HL, Adroher FJ, García-Fernández P (1999) Studies on the transmission of *Theileria annulata* to cattle by the tick *Hyalomma lusitanicum*. *J Vet Med Ser B* 46:505–509

Exp Appl Acarol (2017) 72:449–459
DOI 10.1007/s10493-017-0167-1



In vitro feeding of *Hyalomma lusitanicum* ticks on artificial membranes

J. González² · F. Valcárcel¹ · A. Aguilar¹ · A. S. Olmeda³

Received: 20 April 2017 / Accepted: 14 August 2017 / Published online: 24 August 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract In vitro feeding of ticks (Acari: Ixodidae) is an important means to study the biology of ticks and their vectorial capacity. Here, we have adapted the tick *Hyalomma lusitanicum* Koch to previously published silicone-based membranes for in vitro feeding. For comparison purposes data on pre-oviposition, oviposition and hatching from females engorged on animals were used. A total of 68 engorged females out of 169 were obtained; feeding duration and feeding behaviour were similar to that of ticks on live host animals, although the final weight achieved for membrane-fed ticks was lower than that of their animal-fed counterparts. Comparison of the time taken for egg production and hatching showed that pre-oviposition was faster for membrane-fed ticks (16 days) than for animal-fed ticks (36 days), whereas the duration of oviposition–hatching was the same for the two feeding methods (34 days). We also observed that seasonality has an influence on tick feeding success: the conditions in Spring/Summer accelerated the tick life cycle. It is concluded that relatively large numbers of homogeneous laboratory-raised *Hyalomma* ticks can be produced without feeding them on experimental animals.

Keywords Membrane tick feeding · Alternative experimental methods · *Hyalomma lusitanicum*

✉ F. Valcárcel
valcarcel.felix@inia.es

¹ Grupo de Parasitología Animal, Animalario del Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), 28040 Madrid, Spain

² Villamagna SA, Finca “La Garganta”, 14440 Villanueva de Córdoba, Córdoba, Spain

³ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Introduction

In order to understand the biology of ticks and their important vectorial capacity, tick colonies should be formed under laboratory conditions. The life cycle of all hard ticks (Ixodidae) consists of the egg and three active stages (larva, single nymph, and adult); the success of ixodid ticks depends on maximizing the amount of blood taken at each feeding (only one intake per stage) which last for several days and often for more than a week during which time immature ticks grow and adult females produce eggs (Diehl et al. 1982). Tick engorgement behavior is associated with the specific host chosen (Waladde and Rice 1982). Traditionally, live animals such as mice, rats, guinea-pigs and rabbits have been used for tick attachment and feeding in laboratory settings (Rau 1965; Heyne et al. 1987; Troughton and Levin 2007). However, the trend in research is to reduce or eliminate the use of live animals in experimental assays due to ethical and logistical considerations. The 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) were developed as a framework for humane animal research. Once scientists and politicians came to an agreement on the need to avoid or reduce the number of animals used in research studies, increasing animal welfare legislation has been developed.

Furthermore, transmission studies using animals are expensive and are difficult to replicate because of the large number of different variables. It is therefore preferable to design alternative systems to produce homogeneous tick colonies under laboratory conditions. Artificial tick feeding systems are being used to perform a number of studies in the search for new products with insecticide and/or acaricide activity (Dautel 2004; Kröber and Guerin 2007a; Kröber et al. 2013), for the artificial infection of ticks with pathogens (Bouwknegt et al. 2010; Bonnet and Liu 2012; Fourie et al. 2013) and even for genomic studies for the development of tick vaccines (Lew-Tabor et al. 2014). Since the 1960s researchers have been searching for an artificial feeding technique for hard ticks. The use of capillary tubes (Joyner and Purnell 1968) is still used today as it permits research into the transmissions of pathogens and the development of parasites inside the tick (Gonsioroski et al. 2012), but a membrane permit natural tick attachment and is also frequently used for tick feeding assays (Bonnet and Liu 2012). Following preliminary studies (Doube and Kemp 1979; Waladde et al. 1991, 1996; Kuhnert et al. 1995; Kuhnert 1996), regarding membrane material to get elasticity, and characteristics to accommodate tick mouthparts, Kröber and Guerin (2007a) designed an in vitro feeding system capable of replicating the in vivo situation on the host to feed different tick species with some modifications, since each tick species has a number of morphological characteristics and different preferences and ethological needs.

The tick species targeted in this study is *Hyalomma lusitanicum* Koch, a three-host tick adapted to Mediterranean areas where hosts are abundant, mainly wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) for immature stages and wild and domestic ungulates, mainly red deer (*Cervus elaphus* L.) for adults (Estrada-Peña et al. 2004; Ruiz-Fons et al. 2006; Valcárcel et al. 2016a, b; González et al. 2016). It is apparently the most abundant exophilic tick in the Central Spain (Basco et al. 2008) and is the vector or reservoir of several pathogens (Viseras et al. 1999; Habela et al. 1999; Toledo et al. 2009a, b; Estrada-Peña et al. 2012). *H. lusitanicum* is larger and more robust than other *Hyalomma* species (Estrada-Peña et al. 2004). Unfed ticks measure 5–6 mm and have a longer hypostome (females: 1000 µm; males: 750 µm) than *Ixodes ricinus* L. (females: 500 µm; males: 280 µm), the tick species used to design the in vitro feeding technique (Kröber and Guerin 2007b). The length of the hypostome determines the thickness of the silicone membrane as the tick needs to attach

for several days and then detach when gorged. Moreover, attachment stimuli and blood composition are also keys for feeding success.

In this work we describe how we have adapted membrane feeding assay (Kröber and Guerin 2007a) to accommodate *H. lusitanicum* for tick breeding under laboratory conditions avoiding the large and expensive use of experimental hosts animals.

Materials and methods

Membrane feeding (MF)

The materials (silicone membranes, feeding units, hair extract) and the experimental design were based on the in vitro feeding assay previously described by Kröber and Guerin (2007a) with minor modifications to accommodate the physiological characteristics of *H. lusitanicum* and technical convenience. As attachment stimuli we used red deer hair and cow hair extract. Feeding units were closed with plastic plugs (Falcon, Corning, NY, USA) and placed in Nunclon Delta Surface six-well cell culture plates (3.5 mm diameter/well; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) in a thermostatic waterbath at 37 °C.

Aliquots (12 ml frozen at −20 °C) of sterile commercial defibrinated ovine blood (Oxoid, Madrid, Spain) were thawed at 4 °C and used for the experiment. Every 3 ml of blood was supplemented with 4 µl of a Gentamicin solution (5 mg/ml in deionized water, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) and 4 µl of ATP 100 mM (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Glucose was not used in the experiment. ATP was frozen at −20 °C until first use and was then kept chilled at 4 °C.

Every feeding unit was placed in a cell with 2.8 ml of blood preheated to 37 °C on a hot plate and replaced every 12 h. Silicone membrane was carefully cleaned with preheated (37 °C) distilled water during blood changes. The feeding system was exposed to artificial lighting with a natural light–dark cycle.

Hyalomma lusitanicum adults (6–10 females and 4–5 males) were used per feeding unit. Ticks were previously collected by flagging from the field in a game reserve located in Ciudad Real (Spain). Before use, they were maintained in an incubator (25 °C and 85% RH) with natural light–dark cycle between 2 and 7 months.

Animal feeding (AF)

From 2014 to 2016, 310 engorged females were collected from red deer or wild boar in the game reserve of Ciudad Real (same sampling area as for questing ticks). Data on pre-oviposition, oviposition and hatching were used to compare with membrane feeding data.

Tick maintenance

Animal and membrane fed engorged females were kept individually in glass laboratory tubes closed with cotton in an incubator with natural light–dark cycle (25 °C and 85% RH) until oviposition and hatching of larvae.

We defined two periods for the study: ‘pre-oviposition’ as the time required from incubation until female ticks start laying eggs, and ‘oviposition–hatching’ as the period from the end of pre-oviposition until the first egg hatched. Egg masses were not

manipulated in order to achieve the highest survival rate and therefore the total number of eggs and hatching percentage are not included in this study.

Statistical analysis

SPSS v.20 software (IBM-SPSS, Armonk, NY, USA) was used. Student's t-tests were performed to compare membrane and animal feeding according to season (Spring/Summer and Autumn/Winter). The duration of the feeding period, weight of engorged females, pre-oviposition and oviposition–hatching periods were used as parameters. The χ^2 test was used to assess differences in engorgement rates (engorged females/total females).

Results and discussion

The membrane feeding system (Kröber and Guerin 2007a) was successfully adapted to *H. lusitanicum* with minor modifications. A total of 68 engorged females out of 169 were obtained (engorgement rate: 40.2%), of which 69.1% (47/68) laid eggs with a hatching rate of 53.2% (25/47). In other artificial membrane feeding studies, the engorgement rate for *Ixodes scapularis* Say was 38.8% after 13 days (Andrade et al. 2014) and 49.6% for *Dermacentor reticulatus* Fabricius (Krull et al. 2017) using fresh blood supplemented with glucose (2 g/l). In the case of the latter tick species the rate decreased to 37.8% using thawed blood. Therefore, our percentage of engorged females was comparable to that of previous studies but our study had the advantage of using commercial defibrinated blood, aseptically collected from healthy animals thus standardizing the assays and simplifying the experiment.

In this study ticks did not feed synchronously, the attachment rate of *H. lusitanicum* reached the 70% at day 5–6. Similar attachment rates have been reported for *Hyalomma anatolicum anatolicum* Koch and *Hyalomma dromedarii* Koch (75 and 55%, Tajeri and Razmi 2011) although our system was slightly faster lasting 11 days on average versus 15–16 days in the study of Tajeri and Razmi.

Other authors have reported a feeding period for *H. lusitanicum* on animals under laboratory conditions of approximately 10 days on calves (Ouhelli and Pandey 1984; Ouhelli 1994) and 17 days on sheep (Cota Guajardo 2015). Similar data were obtained for other related tick species such as *Hyalomma asiaticum* Schulze & Schlottke, fed on rabbits for 10 days (Chen et al. 2009) or *H. dromedarii*, for 10–12 days (Ouhelli 1994; Alahmed and Kheir 2003), *Hyalomma rufipes* Koch, fed on rabbits (13 days) and sheep (16 days) (Chen et al. 2012), and *H. anatolicum* (Ahmed et al. 2011), whose adults spent between 6 and 10 days feeding on rabbit (8 days), sheep (6 days) or goat (10 days). Only when feeding on tortoises, *Hyalomma aegyptium* L. females lasted 25 days on average (Široký et al. 2011). Presumably there are major differences among certain ticks referred to attachment behavior; not just host choice but also preferred site recognition and conditions (stimuli) that could accelerate or delay the complex feeding sequence (Waladde and Rice 1982).

In this study the average weight of the artificially engorged females was 274.65 mg. This weight was lower than achieved from feeding on calves (543 mg; Ouhelli and Pandey 1984; Ouhelli 1994). Similar membrane-based systems also achieved a low average weight for *I. scapularis* or *D. reticulatus* engorged females (109 and 221.9 mg, Andrade et al. 2014; Krull et al. 2017). In the same sense, capillary-based in vitro tick feeding studies

using partially engorged females recovered from animals got a low final weight for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini and *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann (Gonsioroski et al. 2012; Lew-Tabor et al. 2014; Ribeiro et al. 2014). This is in accordance with the review of feeding techniques made by Bonnet and Liu (2012) that indicated that the weight of membrane-fed ticks tends to be lower to that of animal-fed ones. It is important to note that despite of this low average weight, engorged females were usually able to successfully complete egg-laying.

Differences were observed when comparing the development times (pre-oviposition, oviposition and hatching) of MF and AF ticks. The percentage of engorged MF females that laid eggs (69%) was similar than their AF counterparts (73%) whilst the difference in the hatching rate was greater (MF 53% vs AT 93%). Nevertheless, it is necessary to clear that the most important parameters that influence the life cycle in the laboratory are the time taken for egg production and hatching. We observed differences in the length of pre-oviposition ($t = -7.45$; $df = 92$; $P < 0.001$), MF being faster (16 days, Table 1) than AF (36 days, Table 2). However, the duration of oviposition–hatching was the same for both feeding methods (34 days; $t = 0.01$; $df = 25$; $P = 0.99$; Fig. 1).

Previous studies feeding on experimental laboratory animals completed the *H. lusitanicum* life cycle on 138–196 days (Ouhelli and Pandey 1984; Ouhelli 1994; Cota Guajardo 2015). In our case the oviposition and oviposition–hatching periods (16 and 34 days, Fig. 1) were shorter than in these studies (pre-oviposition, 8–47 days; oviposition, 16–26 days; hatching, 22–36 days). In consequence, the cycle of *H. lusitanicum* using the MF technique is equal or faster than using experimental animals for feeding.

One important conclusion of this study is that the success of the membrane feeding was strongly influenced by the season in which ticks are sampled on field. In Spring/Summer, the percentage of engorged females was higher than in Autumn/Winter (47.3 and 31.6%; $\chi^2 = 4.30$; $df = 1$; $P < 0.05$). In the same way, the rate and length of pre-oviposition were higher (75 and 58%, no significant difference) and shorter in Spring/Summer than in Autumn/Winter (10 and 31 days $t = -3.44$; $df = 13$; $P < 0.01$) (Table 1; Fig. 2). This period is usually influenced by temperature (Diehl et al. 1982; Ouhelli 1994); however, in our study temperature during pre-oviposition was always constant both for MF and AF. In consequence differences between seasons could be due to climatic influence during the host seeking time instead of during pre-oviposition period.

The final weight of MF engorged females was similar irrespective of season (Table 1). Heaviest engorged females (400–600 mg) were only fed in Spring/Summer MF assays and curiously they spent fewer days in the pre-oviposition period than low weight ones (Fig. 3). Finally, no seasonal differences were observed either in the length of oviposition–hatching (Table 1; Fig. 2).

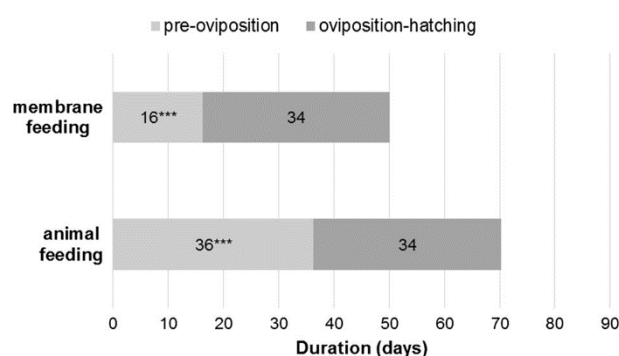
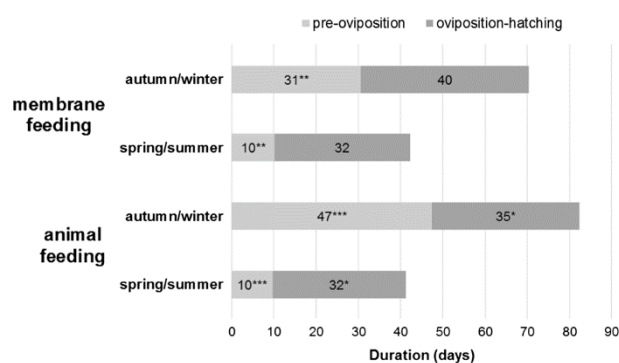
The length of pre-oviposition and oviposition–hatching periods are very important for the purpose of establishing expected success rates. We observed that its length of in AF ticks was much shorter in Spring/Summer than in Autumn/Winter (pre-oviposition $t = -26.31$; $df = 203$; $P < 0.001$; oviposition–hatching $t = -2.31$; $df = 72$; $P < 0.05$) (Table 2; Figs. 2, 4). Previous studies reported that *H. lusitanicum* does not appear to undergo a real winter diapause and adults are able to survive the winter with a very low activity (Valcárcel et al. 2016a, b). So, overwintering females probably need to complete the feeding very quickly in Spring explaining why these important periods, pre-oviposition and oviposition–hatching, are faster in Spring/Summer than in Autumn/Winter, as we observed when feed them on animal or membrane (Fig. 4).

Table 1 Results of membrane feeding (MF) of *Hyalomma lusitanicum* according to the seasons; n = engorged females obtained

	Total membrane feeding				Membrane feeding in Spring/Summer				Membrane feeding in Autumn/Winter			
	Mean		SD		Mean		SD		Mean		SD	
	n	Min-max	n	Min-max	n	Min-max	n	Min-max	n	Min-max	n	Min-max
Feeding (days)	68	11.0	2.4	8-20	44	10.9	2.7	8-20	24	11.1	1.6	9-16
Weight (mg)	65	274.7	123.6	52-600	44	292.2	129.1	80-600	21	237.9	104.6	52-400
Pre-oviposition (days)	47	16.3	15.4	6-92	33	10.2	3.5	6-19	14	30.6	22.2	9-92
Oviposition-hatching (days)	25	33.9	19.6	17-95	19	32.1	16.7	17-78	6	39.7	28.0	23-95

Table 2 Results of the development periods of naturally animal fed (AF) *Hyalomma lusitanicum* females according to the seasons; n = engorged females collected

	Total animal feeding				Animal feeding in Spring/Summer				Animal feeding in Autumn/Winter			
	n	Mean	SD	Min–max	n	Mean	SD	Min–max	n	Mean	SD	Min–max
Pre-oviposition (days)	227	36.3	22.4	4–84	67	9.7	4.5	4–26	160	47.5	16.8	8–84
Oviposition–hatching (days)	211	33.9	7.3	9–63	62	31.6	10.8	9–63	149	34.9	5.0	21–47

**Fig. 1** Comparison of the mean duration of pre-oviposition and oviposition–hatching under laboratory conditions (25 °C and 85% RH) in artificial and animal fed females of *Hyalomma lusitanicum*. Asterisks indicate significant group differences (*t* test): $P < 0.001$ (***)**Fig. 2** Comparison of the mean duration of pre-oviposition and oviposition–hatching under laboratory conditions (25 °C and 85% RH) in membrane and animal feeding females of *Hyalomma lusitanicum* according to the seasons of collection (spring/summer or autumn/winter). Asterisks indicate significant group differences (*t* test): $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

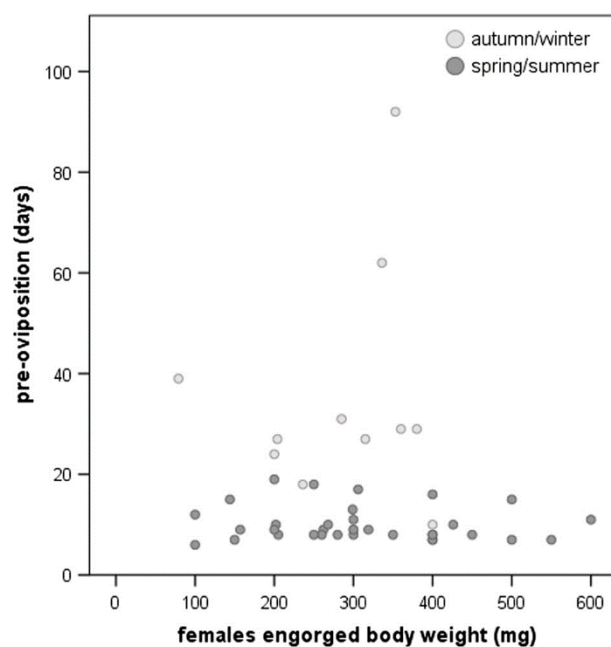


Fig. 3 Relationship between the length of the pre-oviposition and the weight of each *Hyalomma lusitanicum* female engorged through membrane feeding, according to the seasons of the in vitro assay (spring/summer or autumn/winter)

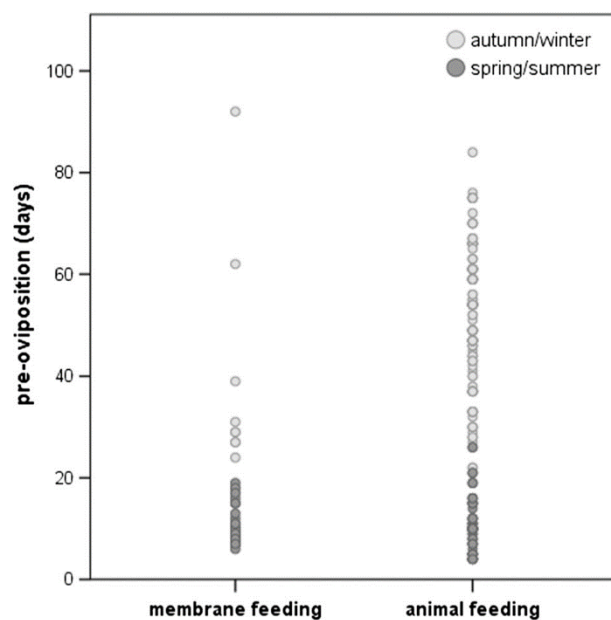


Fig. 4 Length of the pre-oviposition in each membrane and animal feeding of *Hyalomma lusitanicum* females, according to the seasons (spring/summer or autumn/winter)

The modifications that we propose have been successfully adapted to fed *Ixodes hexagonus* and *Dermacentor marginatus* adults and for *H. lusitanicum* larvae with promising preliminary results although the engorgement rate is very low yet.

Conclusions

It can be concluded that this membrane feeding system is in line with what has been observed for other *Hyalomma* species on live host animals and therefore this technique replicates natural attachment and feeding behavior. An apparent disadvantage is that weight of engorged females is lower than that of their animal-fed counterparts. However, despite of this low weight, females can perfectly complete egg laying.

Membrane feeding have showed some important advantages: engorgement rates and duration of oviposition–hatching were similar to those reported in previous studies; secondly, the use of sterile commercial defibrinated blood allows to produce large numbers of homogeneous laboratory-raised specimens and experimental simplicity. Finally, the adaptation of MF to new tick species will allow to perform a great variety of studies (vectorial competence or capacity, drug tests, etc.) reducing/avoiding long and expensive costs studies with experimental animals.

Acknowledgements The authors are especially grateful to his Grace the Duke of Westminster, for his support during all the studies. This project was financed by the Villamagna SA and the project RTA-2014-00080-00-00.

References

- Ahmed BM, Taha KM, Hussein AME (2011) Life cycle of *Hyalomma anatolicum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) fed on rabbits, sheep and goats. *Vet Parasitol* 177:353–358. doi:[10.1016/j.vetpar.2010.12.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.012)
- Alahmed AM, Kheir SM (2003) Life cycle and survival of *H. dromedarii* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Agric Mar Sci* 8:11–14
- Andrade JJ, Xu G, Rich SM (2014) A silicone membrane for in vitro feeding of *Ixodes scapularis* (Ixodidae). *J Med Entomol* 51:878–879. doi:[10.1603/ME13180](https://doi.org/10.1603/ME13180)
- Basco PB, Álvaro AC, Guajardo SC et al (2008) Estudio de control biológico de garrapatas en la finca “La Garganta”. *Rev Complut Cienc Vet* 2:73–84
- Bonnet S, Liu XY (2012) Laboratory artificial infection of hard ticks: a tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission. *Acarologia* 52:453–464. doi:[10.1051/acarologia/20122068](https://doi.org/10.1051/acarologia/20122068)
- Bouwknegt C, van Rijn PA, Schipper JJM et al (2010) Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Exp Appl Acarol* 52:183–192. doi:[10.1007/s10493-010-9359-7](https://doi.org/10.1007/s10493-010-9359-7)
- Chen Z, Yu Z, Yang X et al (2009) The life cycle of *Hyalomma asiaticum kozlovi* Olenov, 1931 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 160:134–137. doi:[10.1016/j.vetpar.2008.10.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.028)
- Chen Z, Li Y, Liu Z et al (2012) The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 56:85–92. doi:[10.1007/s10493-011-9490-0](https://doi.org/10.1007/s10493-011-9490-0)
- Cota Guajardo SC (2015) Control Biológico E Integrado De La Garrapata *Hyalomma lusitanicum* En Explotaciones Silvo-Agro-Cinegéticas De Ecosistema Meso-Mediterráneo. Universidad Complutense de Madrid, Madrid
- Dautel H (2004) Test systems for tick repellents. *Int J Med Microbiol* 293:182–188
- Diehl PA, Aeschlimann A, Obenchain FD (1982) Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: Obenchain FD, Galun R (eds) *Physiology of ticks*. Pergamon Press, Oxford, pp 310–343
- Doube BM, Kemp DH (1979) The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. *Int J Parasitol* 9:449–454

- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR (2004) Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Zaragoza
- Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P et al (2012) Crimean-congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* 18:179–180. doi:[10.1016/j.antiviral.2004.08.001](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.001)
- Fourie JJ, Stanneck D, Luus HG et al (2013) Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol* 197:595–603. doi:[10.1016/j.vetpar.2013.07.026](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.026)
- Gonsioroski AV, Bezerra IA, Utiumi KU et al (2012) Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* females. *Exp Parasitol* 130:359–363. doi:[10.1016/j.exppara.2012.02.006](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.006)
- González J, Valcárcel F, Pérez-Sánchez JL et al (2016) Seasonal dynamics of ixodid ticks on wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae) from Central Spain. *Exp Appl Acarol* 70:369–380. doi:[10.1007/s10493-016-0069-7](https://doi.org/10.1007/s10493-016-0069-7)
- Habela M, Rol JA, Antón JM et al (1999) Epidemiology of *Mediterranean theileriosis* in Extremadura region, Spain. *Parassitologia* 41:47–51
- Heyne H, Elliott EGR, Bezuidenhout JD (1987) Rearing and infection techniques for *Amblyomma* species to be used in heartwater transmission experiments. *Onderstepoort J Vet Res* 54:461–471
- Joyner LP, Purnell RE (1968) The feeding behaviour on rabbits and in vitro of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Parasitology* 58:715–723
- Kröber T, Guerin PM (2007a) An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Manag Sci* 63:17–22. doi:[10.1002/ps.1293](https://doi.org/10.1002/ps.1293)
- Kröber T, Guerin PM (2007b) In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends Parasitol* 23:445–449. doi:[10.1016/j.pt.2007.07.010](https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.010)
- Kröber T, Bourquin M, Guerin PM (2013) A standardised in vivo and in vitro test method for evaluating tick repellents. *Pestic Biochem Physiol* 107:160–168. doi:[10.1016/j.pestbp.2013.06.008](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.008)
- Krull C, Böhme B, Clausen P-H, Nijhof AM (2017) Optimization of an artificial tick feeding assay for *Dermacentor reticulatus*. *Parasit Vectors*. doi:[10.1186/s13071-017-2000-4](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2000-4)
- Kuhnert F (1996) Feeding of hard ticks in vitro: new perspectives for rearing and for the identification of systemic acaricides. *Altex* 13:76–87
- Kuhnert F, Diehl P-A, Guerin PM (1995) The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* in vitro. *Int J Parasitol* 25:887–896
- Lew-Tabor AE, Bruyeres AG, Zhang B, Rodriguez Valle M (2014) *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks Tick Borne Dis* 5:500–510. doi:[10.1016/j.ttbdis.2014.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.005)
- Ouhelli H (1994) Comparative development of *Hyalomma marginatum* (Schulze, 1919), *H. anatolicum* excavatum (Koch, 1844), *H. lusitanicum* (Koch, 1884) and *H. dromedarii* (Koch, 1844) under laboratory conditions. *Acta Parasitol* 39:153–157
- Ouhelli H, Pandey VS (1984) Development of *Hyalomma lusitanicum* under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 15:57–66. doi:[10.1016/0304-4017\(84\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(84)90110-9)
- Rau U (1965) Some observations on the feeding of ticks on experimental animals with special reference to the pill box method. *J Med Entomol* 2:58–60
- Ribeiro CCDU, de Azevedo Baêta B, de Almeida Valim JR et al (2014) Use of plastic tips in artificial feeding of *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens* females Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis* 5:689–692. doi:[10.1016/j.ttbdis.2014.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.05.012)
- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P et al (2006) Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol* 140:133–142. doi:[10.1016/j.vetpar.2006.03.033](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.033)
- Široký P, Erhart J, Petrželková KJ, Kamler M (2011) Life cycle of tortoise tick *Hyalomma aegyptium* under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 54:277–284. doi:[10.1007/s10493-011-9442-8](https://doi.org/10.1007/s10493-011-9442-8)
- Tajeri S, Razmi GR (2011) *Hyalomma anatolicum* anatolicum and *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) imbibe bovine blood in vitro by utilizing an artificial feeding system. *Vet Parasitol* 180:332–335. doi:[10.1016/j.vetpar.2011.03.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.014)
- Toledo A, Jado I, Olmeda AS et al (2009a) Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9:465–468. doi:[10.1089/vbz.2008.0070](https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0070)
- Toledo A, Olmeda AS, Escudero R et al (2009b) Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg* 81:67–74
- Troughton DR, Levin ML (2007) Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J Med Entomol* 44:732–740

- Valcárcel F, González J, Sánchez JLP et al (2016a) Long-term ecological study of host-seeking adults of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a meso-mediterranean climate. J Med Entomol 53:221–224. doi:[10.1093/jme/tjv152](https://doi.org/10.1093/jme/tjv152)
- Valcárcel F, González J, Tercero-Jaime JM, Olmeda AS (2016b) Long-term study of ixodid ticks feeding on red deer (*Cervus elaphus* L.) in a meso-mediterranean climate. J Med Entomol 69:61–72. doi:[10.1007/s10493-015-0008-z](https://doi.org/10.1007/s10493-015-0008-z)
- Viseras J, Hueli LE, Adroher FJ, García-Fernández P (1999) Studies on the transmission of *Theileria annulata* to cattle by the tick *Hyalomma lusitanicum*. J Vet Med Ser B 46:505–509. doi:[10.1111/j.1439-0450.1999.tb01242.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1999.tb01242.x)
- Waladde SM, Rice MJ (1982) The sensory basis of tick feeding behaviour. In: Obenchain FD, Galun R (eds) Physiology of ticks. Pergamon Press, Oxford, pp 72–113
- Waladde SM, Gichuhi PM et al (1991) Artificial-membrane feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. Exp Appl Acarol 11:297–306
- Waladde SM, Young AS, Morzaria SP (1996) Artificial feeding of ixodid ticks. Parasitol Today 12:272–278

Control of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) Ticks Infesting *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) Using the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Hyocreales: Clavicipitaceae) in Field Conditions

J. González,¹ F. Valcárcel,^{2,3} J. L. Pérez-Sánchez,^{2,4} J. M. Tercero-Jaime,² M. T. Cutuli,⁴ and A. S. Olmeda⁴

¹Villamagna SA, Finca “La Garganta”, 14.440 Villanueva de Córdoba, Córdoba, Spain (julgleglez@gmail.com), ²Grupo de Parasitología Animal, Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnologías Agrarias y Alimentarias, INIA, 28040, Madrid, Spain (valcarcel.felix@inia.es; jose_luis_perez_sanchez@hotmail.com; jmtercero@fincalagarganta.com), ³Corresponding author, e-mail: valcarcel.felix@inia.es, and ⁴Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain (mtcutuli@vet.ucm.es; angeles@ucm.es)

Received 14 January 2016; Accepted 12 May 2016

Abstract

Entomopathogenic fungi are widely used to control arthropods not just in agricultural settings but also in Veterinary Medicine and Public Health. These products have been employed to control tick populations and tick-borne diseases. The effectiveness of these control measures not only depends on the fungi, but also on the tick species and environmental conditions. In Mesomediterranean areas, tick species are adapted to extreme climatic conditions and it is therefore especially important to develop suitable tick control strategies. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a new method of tick control which entails the application of a commercial strain of *Beauveria bassiana* (Balsamo, Vuillemin) on wild rabbit burrows under field conditions. Aqueous solutions of the product were applied using a mist blower sprayer into 1,717 burrows. Two trials were performed, one in spring and the other in summer. The parasitic index (PI) was calculated for 10 rabbits per treatment per time point on day +30, +60, and +90 posttreatment and efficiency was calculated by comparing the PI for ticks in treated and untreated rabbits. A total of 20,234 ixodid ticks were collected. *Hyalomma lusitanicum* Koch, 1844 was the most abundant tick feeding on rabbits. Treatment significantly reduced the PI in spring (by 78.63% and 63.28% on day +30 and +60, respectively; $P < 0.05$), but appeared to be less effective in summer, with a marginally significant tick reduction of 35.72% on day +30 ($P = 0.05$). Results suggest that the efficacy of applications inside burrows could be temperature-dependent and that such applications could be an economic alternative to rabbit tick control during at least two months using a diluted solution of *B. bassiana* conidia.

Key words: field, rabbit, entomopathogenic fungi, tick control, biological control

Entomopathogenic fungi are widely used to control arthropods not just in agricultural settings but also in Veterinary Medicine and Public Health. There are biopesticides registered with the Environmental Protection Agency (EPA) based on entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (1883) and *Beauveria bassiana* (Balsamo, Vuillemin), to control flies on horses, dairy cattle, poultry, and swine (balEnce), and as part of integrated pest management against thrips, mites, whiteflies, and weevil larvae in greenhouses and on ornamentals and food crops (Met52). Moreover, these products have been employed to reduce tick abundance and tick-borne diseases and are especially useful against acaricide-resistant strains (Webster et al. 2015). These fungi

have been applied alone or in combination with other acaricides (Hornbostel et al. 2005a), and natural products such as *Melia azedarach* L., with an apparent synergistic effect (Sousa et al. 2011).

The harmful effects of *Beauveria* and *Metarhizium* fungi on ticks include tremors and paralysis (Abdigoudarzi et al. 2009) as well as alterations in the metabolism of lipid profiles, body fat (Angelo et al. 2010b, 2013), and metabolic water (Cradock and Needham 2011a). The effectiveness of this method varies depending not just on the tick species and developmental stage (Kirkland et al. 2004), but also on the fungal species and environmental conditions. Numerous laboratory experiments have been performed to analyze the virulence of a number of fungal isolates (Fernandes et al. 2011,



The effect of excluding ungulates on the abundance of ixodid ticks on wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

F. Valcárcel¹ · J. González^{2,3} · J. M. Tercero-Jaime² · A. S. Olmeda³

Received: 16 March 2017 / Accepted: 14 August 2017 / Published online: 24 August 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract Tick abundance depends heavily on host density, so reducing access to the host should reduce tick populations in a determined area. In this study we compared the Parasitic Index (PI = average number of ticks per rabbit) of two wild rabbit populations separated 16 years ago by a fence keeping ungulates from moving freely. Two areas were selected (closed and open) wherein 50 wild rabbits per area were sampled for ticks. The PI in the open area (PI = 989.62) was significantly higher than in the closed area (PI = 515.40). *Hyalomma lusitanicum* Koch was globally the most abundant species, followed by *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, *Haemaphysalis hispanica* Gil Collado, *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Latreille and *Ixodes ventraloi* Gil Collado. Differences between areas varied depending on the species. The number of *H. hispanica*, *R. bursa* and *R. pusillus* were significantly more abundant on rabbits in the closed area, whereas *H. lusitanicum* predominated in the open area. Ungulates in the open area may have played an important role as the main or alternative host for ticks and/or drawing some tick species away from rabbits. In the closed area other reasons such as inter-specific competition could have influenced the tick abundance. These results show a clear reduction in tick abundance for at least 16 years as well as influenced species distribution.

Keywords Wild rabbits · Tick control · Meso-Mediterranean · Ungulates exclusion

✉ F. Valcárcel
valcarcel.felix@inia.es

¹ Departamento de Reproducción Animal (INIA), Grupo de Parasitología, 28040 Madrid, Spain

² Finca “La Garganta” Villamagna SA, Villanueva de Córdoba, Spain

³ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Introduction

From an ecological point of view, low-level human activity in meso-Mediterranean ecosystems should help to maintain a suitable balance allowing for natural interactions between predators and prey. However this is a fragile balance that is easily disrupted by changes in animal populations. This is especially true in the case of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) in the Iberian Peninsula as this animal is not only an important hunting species in many game reserves but also plays a vital role in the food chain of nature reserves helping to maintain the populations of endangered predators such as the Imperial eagle (*Aquila adalberti* C. L. Brehm) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus* Temminck).

Rabbit populations were declining in the second half of twentieth century due to diseases such as Rabbit Hemorrhagic Disease or Myxomatosis (Rogers et al. 1994; Calvete 1999; Virgós et al. 2007). However, these populations may also be affected by competition with other hosts such as large ungulates owing to the decreasing availability and quality of food (Carpio et al. 2014).

Only a few species of Iberian ixodid ticks feed on *O. cuniculus*: *Dermacentor marginatus* Sulzer, *Haemaphysalis hispanica* Gil Collado, *Hyalomma lusitanicum* Koch, *Ixodes ricinus* L., *Ixodes ventralloi* Gil Collado, *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, and *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado (Soriguer 1980; Rodríguez 1980; Rodríguez et al. 1981; Márquez 1993; González et al. 2016). In the study area, *Ha. hispanica* and *I. ventralloi* were only found on rabbit while *I. ricinus* and *R. bursa* were found on ungulates but not rabbits; *H. lusitanicum*, *R. pusillus* and *D. marginatus* may occasionally be found on both hosts (Valcárcel et al. 2016b; González et al. 2016).

As tick abundance depends heavily on host density (Wilson et al. 1985; Estrada-Peña et al. 2008; Gilbert 2010; Kilpatrick et al. 2014), reducing access to the host should reduce tick populations in a determined area. In fact, host exclusion has proven to reduce *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum* and *I. ricinus* populations (Stafford 1993; Ginsberg et al. 2002; Ruiz-Fons and Gilbert 2010). However such exclusionary measures were not equally effective against all stages of tick development. Small and medium sized mammals most likely serve as alternative hosts for ticks at specific developmental stages (Daniel and Fish 1995) thus producing only a short-lived reduction in tick populations (Ginsberg et al. 2002). Other authors found only limited evidence that deer movements between habitats bring about major changes in tick populations (Ruiz-Fons and Gilbert 2010). As it is difficult to keep fencing up for long periods of time in large areas, long term effects have not been studied. To determine the effect that the exclusion of ungulates has on ixodid ticks, in this study we compared the parasitic index of two wild rabbit populations that were separated 16 years ago by a fence.

Materials and methods

Study area

The study was conducted in a natural reserve in Ciudad Real (Central Spain: 37°24'78"N 42°59'101"E), representative of a meso-Mediterranean bioclimatic environment whose characteristics have been described in a previous publication (González et al. 2016). For this study we selected two areas (one closed and one open) that were separated 16 years ago by a hunting fence (2 m high) keeping ungulates from moving freely. The two areas, closed (340 ha) and open (540 ha) had similar flora: holm oak meadows *Quercus*

rotundifolia L., farm crops and native shrub species such as *Cistus ladanifer* L. and *Genista hirsuta* Vahl; and similar fauna: partridge *Alectoris rufa* L., hare *Lepus europaeus* L. and wild rabbit *O. cuniculus* with the exception of ungulates which were only present in the open area, mainly red deer *Cervus elaphus* L., although small numbers of wild boar *Sus scrofa* L. and roe deer *Capreolus capreolus* L. were also present. Due to the presence of ungulates, wild rabbit populations in this area are lower than in the closed one.

Tick sampling

A total of 100 wild rabbits were captured (50 per area) in summer when the greatest number of ticks infest wild rabbits in these areas (González et al. 2016). After culling, rabbits were hung upside down over a bucket containing a small amount of water for 24 h at room temperature to allow the ticks to detach from the host and fall into the water. That water was then filtered through gauze to recover the specimens. The Parasitic Index (PI) was expressed as the average number of ticks per rabbit.

Tick identification

Specimens were kept in 70% alcohol for subsequent classification in the laboratory. We used specific keys for the identification of different stages (Hoogstraal and Morel 1970; Gil-Collado et al. 1979; Manilla 1998; Estrada-Peña et al. 2004; Apanaskevich et al. 2008).

Statistical analysis

Differences in PI between the two areas were determined by *t* test.

Results

Ticks on rabbits

A total of 75,251 ticks were collected from rabbits with a PI of 752.51 ticks (SD = 461.99, min = 55, max = 2508). *Hyalomma lusitanicum* was the most abundant of the six Ixodidae species identified followed by *R. pusillus*, *R. bursa*, *H. hispanica*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Latreille and *I. ventralloi*.

The percentage of each species varied greatly depending on the place of collection (Fig. 1). The PI of rabbits collected in the open area (PI = 989.62; SD = 500.98; min = 241; max = 2508) was significantly higher than in the closed area (515.40; SD = 255.93; min = 55; max = 1287) (*t*-test value = 5.961 98 degree of freedom (dg); $P < 0.001$). These global differences were not the same for all species. The PI of *Ha. hispanica*, *R. bursa* and *R. pusillus* were significantly higher in the closed area whilst *H. lusitanicum* was the predominant species in the open area (Table 1).

Larvae were the most representative stage followed by nymphs while low numbers of males and females were recovered. Most of the stages of all the species were significantly higher in the closed area than in the open area with the exception of *H. lusitanicum* with a significantly higher PI in the open area (Fig. 2a, b). Very few *R. sanguineus* s.l. or *I. ventralloi* were found.

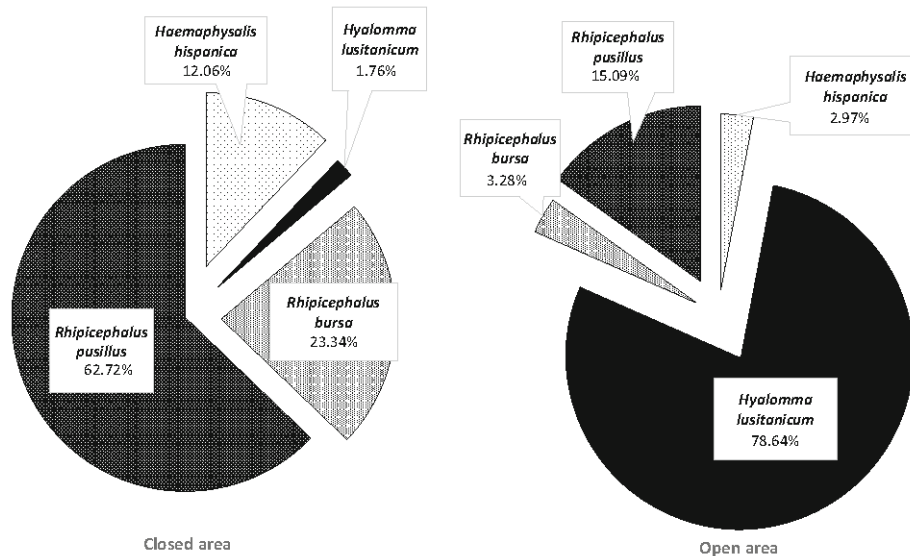


Fig. 1 Tick distribution in two wild populations separated 16 years ago by a hunting fence in order to avoid (closed area) or to allow ungulates presence (open area). *Rhipicephalus sanguineus* (0.097 and 0.018%) and *Ixodes ventralis* (0.023 and 0.004%) (closed and open areas) are not represented

Discussion

The percentage of the different species in the closed area could be considered as the normal distribution affecting wild rabbits in areas without large mammals, i.e. that previously described for the Iberian Peninsula (Soriguer 1980; Rodríguez 1980; Rodríguez et al. 1981; Márquez 1993; González et al. 2016). However, it would appear that ungulates in the open area played an important role as the main or alternative host for these or other tick species. There is, therefore, a clear difference in tick species distribution when compared to the closed area. This is especially noticeable in the case of the three host tick *H. lusitanicum*; red deer is the main host for adult stages in many meso-Mediterranean areas (Ruiz-Fons et al. 2006; Valcárcel et al. 2016b). Therefore, the presence of deer should have permitted the survival of adult stages for long periods. *Hyalomma lusitanicum* can be active all year either host seeking and/or feeding on red deer (Valcárcel et al. 2016a, b). We also found a high abundance of immature stages feeding on wild rabbit showing that there is a continuous addition of immature stages in the field. This finding also corroborates those of other studies (Márquez and Jiménez Millán 1988; González et al. 2016).

Rhipicephalus pusillus is one of the most characteristic and persistent tick species affecting wild rabbits in the Iberian Peninsula (Soriguer 1980; Rodríguez 1980; Rodríguez et al. 1981; Márquez 1993). However, it is not usually the most abundant species in this area (González et al. 2016) and the results in the open area are in line with expected values.

Rhipicephalus bursa is a vector of several pathogens (Soulsby 1987; Yeruham et al. 2001; Tonbak et al. 2006; Bristol University 2017; Shayan et al. 2007; Telmadarrai et al. 2010) but little is known about its life cycle in the field. In some areas in Iran it is considered one of the dominant species infecting ungulates (Moshaverinia et al. 2012; Monfared et al. 2015) although in meso-Mediterranean areas there are very few or none at all feeding on rabbits (Rodríguez et al. 1981; Márquez and Guiguen 1992; Valcárcel et al.

Table 1 Parasitic index (ticks per animal) of each tick species recovered on two rabbit populations after 16 years of ungulates exclusion

	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>	<i>Haemaphysalis hispanica</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Ixodes ventralis</i>
Closed area $n = 50$						
Ticks collected	454	16,164	6014	3107	25	6
Mean	9.08	323.28***	120.28**	62.14**	0.50	0.12
SD	22.74	261.59	250.57	79.53	1.50	0.39
Min	0	0	0	2	0	0
Max	150	1192	1212	398	9	2
Open area $n = 50$						
Ticks collected	38,912	7466	1624	1468	9	2
Mean	778.24***	149.32	32.48	29.36	0.18	0.04
SD	511.45	119.80	111.92	58.88	0.44	0.20
Min	4	0	0	0	0	0
Max	2382	547	543	240	2	1
t value	10.624	4.275	2.252	2.344	ns	ns
(df = 98)	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.05$		

Closed area no ungulate presence, open area ungulate presence, ns no significant differences using t-test

** and *** significant differences between closed and open areas ($p < 0.05$ and $p < 0.01$)

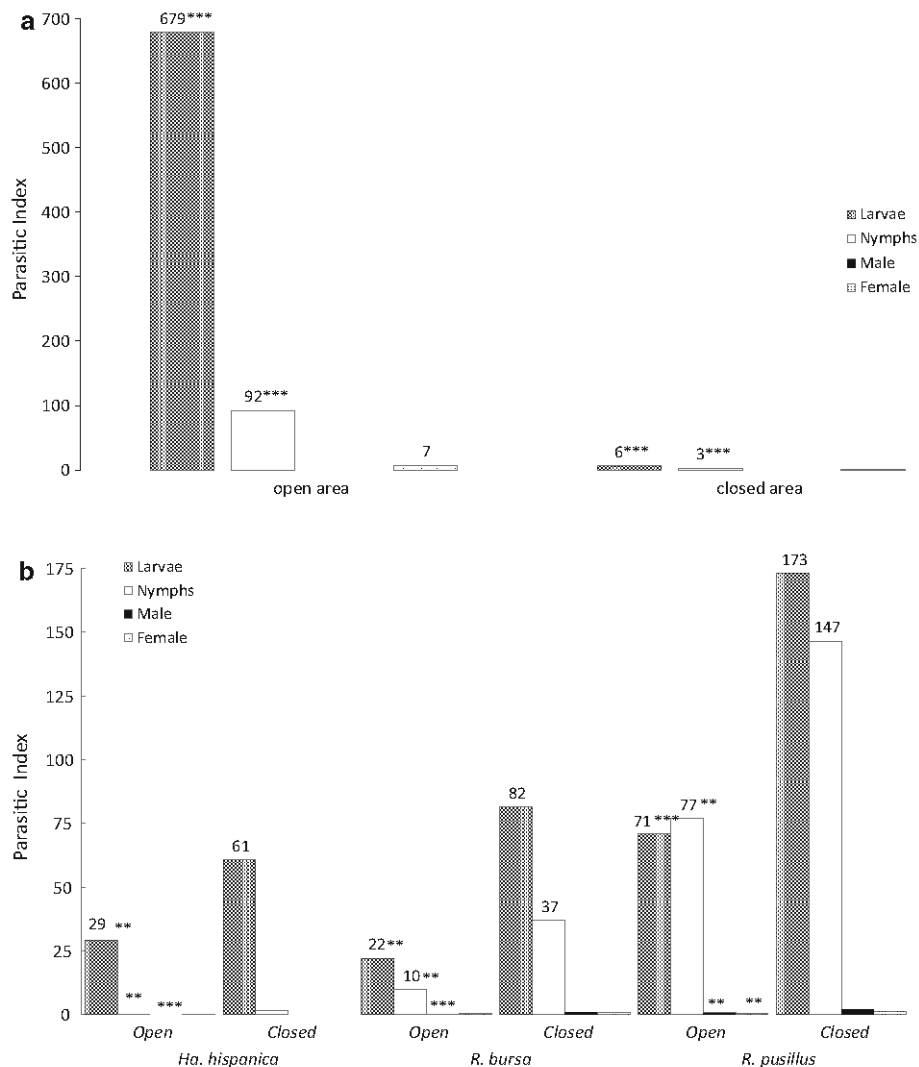


Fig. 2 Parasitic Index of the tick species affecting two wild rabbits populations separated 16 years ago by a hunting fence in order to avoid (*closed area*) or to allow ungulates presence (*open area*). **a** *Hyalomma lusitanicum*. **b** Rest of the species except *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes ventralloi*. ** and *** indicate significant differences between closed and open areas, $0.01 < P < 0.05$ and $P < 0.01$. Those values not represented are below or equal 2

2016b; González et al. 2016). *Rhipicephalus sanguineus* s.l. and *I. ventralloi* are minority species found in summer on wild rabbits (Márquez 1990; Millán et al. 2007) and the results of the study reflect this situation.

The tick burden of small mammal hosts depends on many different variables such as seasonality, climate and spatial factors, including key host per stage (Brunner and Ostfeld 2008). These factors typically work together in a specific area but a particular feature may also influence the abundance of just one stage of tick. For example, the abundance of *I. ricinus* larvae depends heavily on the ungulate population but this is not the case for

nymphs (Ruiz-Fons et al. 2012). In this study, the abundance of *H. lusitanicum* in the open area seems to be related to the presence of red deer so it is reasonable to assume that the low numbers found in the closed area could be due to a progressive decrease after the fence was put up. Similar studies have reported only temporary reductions in *A. americanum* nymphs after excluding red deer as alternative hosts are easy to find (Ginsberg et al. 2002). The feeding process of *H. lusitanicum* adults on rabbits causes serious injury at the attachment point (personal observations) and therefore, in the absence of ungulates, the likelihood of successfully completing the life cycle should be quite low. In this case, as no alternative host is available, tick reduction due to ungulate exclusion is long term.

In our study, all variables except for the presence of ungulates and rabbit abundance (climate, spatial, small fauna, vegetation, seasonality, etc.) were similar in the two sample areas. While there was great abundance of wild rabbits in both areas, population density was lower in the open area, perhaps because ungulates destroy burrows.

In the open area ungulates could also draw *R. bursa* and *R. pusillus* away from rabbits such that the infestation level was similar to that expected (González et al. 2016). However, due to the absence of ungulates in the closed area, both species had easy access to rabbits which are more abundant than in the open area allowing them to survive on their rabbit hosts. However, the PI of both species in the closed area was much higher than expected indicating that there must be other reasons such as inter-specific competition. We did not find any reports on competition between *H. lusitanicum* and *R. bursa* or *R. pusillus* but their respective phenology patterns appear to indicate that infestation by these two latter species is lower in the presence of *H. lusitanicum*.

Similarly, the abundance of *Ha. hispanica* in the closed area—four times greater than in the open area—could be related to the absence of *H. lusitanicum* and not the lack of ungulates because its life cycle in this area is similar to that of *R. pusillus* (González et al. 2016). This rabbit tick species (Hoogstraal and Morel 1970) has not been known to feed on red deer. Hence, this tick species is more likely to feed on rabbits in the closed area following the decline in the number of *H. lusitanicum* at the larval stage.

In conclusion, fencing may be useful in areas where it is difficult to employ traditional measures based on acaricides to control tick populations and tick borne diseases. We agree with the results of the authors who found a reduction in tick populations where red deer were excluded, although only temporary reductions or affecting only one tick stage. Our results show a clear reduction in the main tick species for at least 16 years. Nevertheless it is important to bear in mind that this PI reduction has a strong effect on the distribution percentages of most of the tick species. Hence, epidemiological studies need to be performed simultaneously to know if these measures can modify the natural balance.

Acknowledgements The authors are especially grateful to his Grace the Duke of Westminster, for his support during all the studies. This project was financed by the Villamagna SA and the project RTA-2014-00080-00-00.

References

- Apanaskevich DA, Santos-Silva MM, Horak IG (2008) The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia Parasitol (Praha)* 55:61–74
- Bristol University (2017) <http://bristoltickid.blogs.ilt.org/key-to-genera/rhipicephalus/rhipicephalus-bursa/>. Accessed 15 March 2017

- Brunner JL, Ostfeld RS (2008) Multiple causes of variable tick burdens on small-mammal hosts. *Ecology* 89:2259–2272
- Calvete C (1999) Epidemiología de la Enfermedad Hemorrágica (VHD) 258 y Mixomatosis en el Conejo Silvestre (*Oryctolagus cuniculus* L. 1758) en el valle medio del Ebro: Modelización de VHD y Herramientas de Gestión. Ph.D. dissertation, University of Zaragoza, Spain
- Carpio AJ, Guerrero-Casado J, Ruiz-Aizpurua L, Vicente J, Tortosa FS (2014) The high abundance of wild ungulates in a Mediterranean region: is this compatible with the European rabbit? *Wildl. Biol.* 20:161–166
- Daniel TJ, Fish D (1995) Effect of deer exclusion on the abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) parasitizing small and medium-sized mammals. *J Med Entomol* 32:5–11. doi:[10.1093/jmedent/32.1.5](https://doi.org/10.1093/jmedent/32.1.5)
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR (2004) Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Zaragoza
- Estrada-Peña A, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Gortázar C, de la Fuente J (2008) Evidence of the importance of host habitat use in predicting the dilution effect of wild boar for deer exposure to *Anaplasma* spp. *PLoS ONE* 3(8):e2999. doi:[10.1371/journal.pone.0002999](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002999)
- Gilbert L (2010) Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia* 162:217–225. doi:[10.1007/s00442-009-1430-x](https://doi.org/10.1007/s00442-009-1430-x)
- Gil-Collado J, Guillén JL, Zapatero LM (1979) Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). *Rev Iber Parasitol* 39:107–118
- Ginsberg HS, Butler M, Zhioua E (2002) Effect of deer exclusion by fencing on abundance of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) on Fire Island, New York, USA. *J Vector Ecol* 27:215–221
- González J, Valcárcel F, Pérez-Sánchez JL, Tercero-Jaime JM, Olmeda AS (2016) Seasonal dynamics of ixodid ticks on wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae) from Central Spain. *Exp Appl Acarol* 70:369–380. doi:[10.1007/s10493-016-0069-7](https://doi.org/10.1007/s10493-016-0069-7)
- Hoogstraal H, Morel PC (1970) *Haemaphysalis* (*Rhipistoma*) *hispanica* Gil Collado, a parasite of the European rabbit, redescription of adults, and description of immature stages (Ixodoidea: Ixodidae). *J Parasitol* 56:813–822
- Kilpatrick HJ, Labonte AM, Stafford KC (2014) The relationship between deer density, tick abundance, and human cases of Lyme disease in a residential community. *J Med Entomol* 51:777–784. doi:[10.1603/ME13232](https://doi.org/10.1603/ME13232)
- Manilla G (1998) Acari: Ixodida (Fauna d'Italia). Calderini, Bologna, p 280
- Márquez FJ (1990) Dinámica de la población de *Ixodes ventralis* Gil Collado 1936 (Acarina, Ixodidae) durante 1986–1987 en el sureste de España. *Rev Iber Parasitol* 50:101–116
- Márquez FJ (1993) Chronological structure of the Ixodidae parasitocenosis of *Oryctolagus cuniculus* (L., 1758) (Lagomorpha: Leporidae) in a prospected area in the southeast of the Iberian Peninsula. *Res Rev Parasitol* 53:47–52
- Márquez FJ, Guiguen C (1992) Distribution sur l'hôte des Ixodidés parasites d'*Oryctolagus cuniculus* (L.) et facteurs qui l'affectent. *Acarologia* 33:141–148
- Márquez FJ, Jiménez Millán F (1988) Hacia un modelo de ciclo biológico de *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae). Resultados del muestreo anual de 1986. *Rev Iber Parasitol* 48:433–443
- Millán J, Ruiz-Fons F, Márquez FJ, Viota M, López-Bao JV, Martín-Matoo P (2007) Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores in Spain. *Med Vet Entomol* 21:248–254
- Monfared AL, Mahmoodi M, Fattahi R (2015) Prevalence of ixodid ticks on cattle, sheep and goats in Ilam County, Ilam Province, Iran. *J Parasit Dis* 39:37–40. doi:[10.1007/s12639-013-0267-8](https://doi.org/10.1007/s12639-013-0267-8)
- Moshaverinia A, Dini M, Azizzadeh M (2012) Prevalence of ixodid tick infestation of sheep in the Arasbaran region of Iran. *J Parasit Dis* 36:230–233
- Rodríguez JA (1980) Estudio de Ectoparásitos de Lepóridos de la provincia de Ciudad Real. Ph.D. dissertation, Complutense University of Madrid, Spain
- Rodríguez JA, Zapatero LM, Sánchez-Covisa A (1981) Variación estacional de Ixodidae y Siphonaptera de la provincia de Ciudad Real. *Rev Iber Parasitol* 41:527–538
- Rogers PM, Arthur CP, Soriguer RC (1994) The rabbit in continental Europe. In: *The European rabbit: the history and biology of a successful colonizer*. Oxford University Press, UK, pp 22–63
- Ruiz-Fons F, Gilbert L (2010) The role of deer as vehicles to move ticks, *Ixodes ricinus*, between contrasting habitats. *Int J Parasitol* 40:1013–1020
- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P, Höfle U, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C (2006) Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol* 140:133–142

- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P, Gortázar C, de la Fuente J (2012) Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Appl Environ Microbiol* 78:2669–2676. doi:[10.1128/AEM.06564-11](https://doi.org/10.1128/AEM.06564-11)
- Shayan P, Hooshmand E, Nabian S, Rahbari S (2007) Determination of *Rhipicephalus* Spp. as vectors for *Babesia ovis* in Iran. *Parasitol Res* 101:1029–1033
- Soriguer RC (1980) Ciclo anual de parasitismo por pulgas y garrapatas en el conejo de campo (*Oryctolagus cuniculus* L.) en Andalucía Occidental. España. *Rev Iber Parasitol* 40:539–550
- Soulsby EJJ (1987) *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*, 7a edn. Interamericana, México, p 823
- Stafford KC (1993) Reduced abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with exclusion of deer by electric fencing. *J Med Entomol* 30:986–996
- Telmadarraiy Z, Ghiasi SM, Moradi M, Vatandoost H, Eshraghian MR, Faghihi F, Zarei Z, Haeri A, Chinikar SI (2010) A survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever in livestock and ticks in Ardabil Province, Iran during 2004–2005. *Scand J Infect Dis* 42:137–141
- Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdarendeli A (2006) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *J Clin Microbiol* 44:4120–4124. doi:[10.1128/JCM.00644-06](https://doi.org/10.1128/JCM.00644-06)PMCID:PMC1698322
- Valcárcel F, González J, Pérez Sánchez JL, Jaime Tercero, Olmeda AS (2016a) Long-term ecological study of host-seeking adults of *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean climate. *J Med Entomol* 53:221–224. doi:[10.1093/jme/tjv152](https://doi.org/10.1093/jme/tjv152)
- Valcárcel F, González J, Tercero Jaime JM, Olmeda AS (2016b) Long term study of ixodid ticks feeding on red deer in a meso-Mediterranean climate. *Exp Appl Acarol* 69:61–72. doi:[10.1007/s10493-015-0008-z](https://doi.org/10.1007/s10493-015-0008-z)
- Virgós E, Cabezas-Díaz S, Lozano J (2007) Is the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) a threatened species in Spain? Sociological constraints in the conservation of species. *Biodivers Conserv* 16:3489–3504
- Wilson ML, Adler GH, Spielmann A (1985) Correlation between abundance of red deer and that of the deer tick, *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *Ann Entomol Soc Am* 78:172–176
- Yeruham I, Hadani A, Galker F (2001) The effect of the ovine host parasitaemia on the development of *Babesia ovis* (Babes, 1892) in the tick *Rhipicephalus bursa* (Canestrini and Panzago, 1877). *Vet Parasitol* 96:195–202

6. Resultados y Discusión General

6.1. Fenología de las Garrapatas Mesomediterráneas

6.2. Adaptación de la Técnica de Alimentación Artificial a la Especie *H. lusitanicum*

6.3. Control de la Población de Garrapatas Mesomediterráneas

6.1. Fenología de las Garrapatas Mesomediterráneas

Aunque existen numerosas citas sobre la parasitación por garrapatas mesomediterráneas en la Península Ibérica (Gil-Collado 1948; Cordero del Campillo y col. 1994; Estrada-Peña 1995; Estrada-Peña y col. 2004a), este es el estudio más completo sobre su fenología. El trabajo ha permitido obtener, durante siete años, valiosos datos de la parasitación en los principales hospedadores y de la abundancia relativa en la vegetación de los biotopos más representativos. Si bien este apartado de la fenología se centrará fundamentalmente en la especie mayoritaria *H. lusitanicum*, a lo largo del año también se encontraron otras garrapatas mesomediterráneas con distintas dinámicas estacionales, como *R. bursa*, *D. marginatus* y *R. pusillus* en vegetación y hospedadores, además de *Ha. hispanica*, *I. ventalloi* y *R. sanguineus* en los conejos, e *I. ricinus* en los ciervos (Fig. 1 de la publicación 5.2 y Fig. 2 de la publicación 5.3).

Los adultos de *R. bursa* se encontraron durante todo el año sobre el ciervo, siendo primavera su época de mayor actividad, no sólo parasitando dicho hospedador sino también en búsqueda activa por la vegetación (Fig. 5 del artículo 5.2). Además, se recogió una pequeña proporción de sus estadios inmaduros en los conejos silvestres examinados, aunque no están considerados como uno de sus hospedadores habituales (Estrada-Peña y col. 2004a), pero podrían aprovechar la inactividad de otras especies principales para emerger y prenderse a estos hospedadores.

La especie *D. marginatus*, por el contrario, presentó una dinámica invernal en la zona de estudio, donde sus adultos buscaban hospedador de octubre a diciembre, cuando se empezaban a encontrar también sobre los ciervos; alcanzaban su máximo nivel de parasitación en los meses de invierno (enero y febrero), y después descendía su actividad en primavera hasta permanecer inactivos en verano (Fig. 6 del artículo 5.2). Asimismo, se recogieron algunos ejemplares inmaduros de esta especie en los conejos, descritos también como hospedador de estos estadios (Estrada-Peña y col. 2004a).

Las garrapatas de *R. pusillus*, *Ha. hispanica* e *I. ventalloi* forman parte de la ixodifauna habitual en los conejos silvestres (Rodríguez y col. 1981; Castellà 2002), por lo que no es de extrañar su presencia. Los resultados obtenidos sobre *R. pusillus* muestran un patrón primavera-verano en la dinámica poblacional establecido fundamentalmente por larvas y ninfas (Fig. 5 de la publicación 5.3), coincidiendo con lo descrito por Márquez (1989). En línea con el trabajo de

Márquez y Jiménez Millán (1988), que asociaban el máximo de los estadíos inmaduros de *R. pusillus* con la elevada densidad de población de los conejos y las altas temperaturas de este periodo, nuestra zona de estudio podría corresponderse con las características de ese escenario. Todos los estadíos de esta especie se alimentan principalmente de lepóridos, aunque pueden encontrarse también en otros animales con los que comparten el mismo hábitat o en sus depredadores (Ruiz-Fons y col. 2006; Millán y col. 2007; Sobrino y col. 2012), como demuestran los datos recopilados en la dinámica estacional parasitando al ciervo (Fig. 6 de la publicación 5.2). La fenología de *Ha. hispanica* se considera similar a la de *R. pusillus*, a pesar de tener un comportamiento más endófilo (Márquez 1992; Castellà 2002); sin embargo, nuestros resultados mostraron una menor actividad en primavera, debido quizás a la presencia de otras especies (Fig. 6 de la publicación 5.3). En este sentido, *I. ventalloi* presentó un patrón primaveral para las larvas, diferente al estival descrito por Márquez (1990), aunque de acuerdo con la actividad otoño-invernal definida para los adultos de esta especie (Fig. 7 de la publicación 5.3); una dinámica condicionada, seguramente, por los niveles de humedad que necesitan las especies de este género para desarrollarse, y por la aparente estrategia de limitar la competencia interespecífica con *R. pusillus* y *Ha. hispanica*, mostrando un patrón diferente, como ya explicara Márquez (1990). Se ha descrito que *I. ventalloi* también puede alimentarse sobre otros pequeños animales y sobrevivir cuando la densidad de conejos desciende, por ejemplo, a causa de la enfermedad vírica de la Mixomatosis a principios del otoño (Gilot y col. 1985; Calvete Margolles 1999), un hecho contrastado en la zona de estudio.

La especie *I. ricinus* se encontró en un porcentaje mínimo, parasitando a los ciervos. Este aspecto se debe a que su dinámica poblacional depende de unas condiciones de elevada humedad (Estrada-Peña y col. 2004b) que sólo se alcanzan durante el invierno en ciertas zonas montañosas del área de estudio, donde pocas poblaciones de ciervos acceden, por lo que se explica su escasa abundancia y el patrón otoño-invernal observado (Fig.6 de la publicación 5.2).

Finalmente, de acuerdo con estudios previos (Rodríguez Rodríguez 1980; Hueli y Díaz-Sáez 1987; García-Romero y col. 2000; Basco y col. 2008; Barandika y col. 2011; Santos-Silva y col. 2011), *H. lusitanicum* resultó ser la especie más abundante en la zona de estudio, tanto en vegetación (96,58 %, publicación 5.1) como en los hospedadores examinados (86,83 % en ciervos y 61,47 % en conejos, publicaciones 5.2 y 5.3). No obstante, la densidad de población resultó más abundante que en los citados trabajos. Lógicamente, las diferencias pueden ser

atribuidas a las características de cada zona y a la duración del estudio. En los siete años de estudio no se ha observado una modificación en la distribución descrita por Cota Guajardo (2015), por lo que puede asumirse que es una población estable. El motivo de dicha superpoblación, podría deberse al desequilibrio ambiental producido por la acción humana. Como se ha comentado en la revisión bibliográfica, la finca se ha gestionado desde muy distintas perspectivas, desde las puramente económicas, como la minería, la agricultura o la ganadería, a las orientadas a la actividad cinegética y ambiental. Cada una de ellas ha dejado su huella ecológica, a través de deforestaciones de bosques autóctonos que fueron sustituidos por otras especies arbóreas o el control de determinados animales en favor de otros de mayor interés, entre los que se encuentran los ciervos y conejos, principales hospedadores de *H. lusitanicum*, y responsables de su superpoblación.

En términos generales, nuestro estudio confirma la mayor parte de la información recogida por los tratados clásicos que definen a *H. lusitanicum* como una garrapata de tres hospedadores de meses cálidos (Estrada-Peña 1995; Habela y col. 2000). Se han discutido novedades en algunos aspectos, como que las larvas y las ninfas también parasitan ungulados (con las connotaciones que esto puede tener para la transmisión transestádica de agentes), y que los adultos no detienen su actividad en los meses fríos, habiéndose detectado tanto en vegetación como sobre los animales, si bien es cierto que con menor intensidad que en los otros meses. Así, la coexistencia de los estadios de desarrollo en cada momento señala la complejidad del ciclo y dificulta su análisis. A continuación, se detallan los aspectos más relevantes de la dinámica estacional, tanto en vegetación como en los animales.

Como corresponde al único estadio exófilo (Habela y col. 2000; Estrada-Peña y col. 2004a; Apanaskevich y col. 2008b), se recogieron principalmente adultos en vegetación. No obstante, según nuestros datos, de acuerdo con Cota Guajardo (2015), se ha prolongado el periodo de actividad previamente descrito desde marzo a agosto (Barandika y col. 2011), extendiéndose ahora de febrero a noviembre.

El estudio ha permitido comprobar la perfecta adaptación de esta especie a las variables climáticas de la zona. Se han recogido ejemplares en distintas condiciones, en un amplio rango de temperatura (10-40 °C) y humedad relativa (10-90 %), aunque sus fases no parásitas son más activas cuando se alcanzan medio-altas temperaturas (en torno a 25-40 °C) y una baja humedad

relativa (10-50 %) (Tabla 1 de la publicación 5.1). Como indicaran Requena-García y colaboradores (2017), estos son los dos parámetros más influyentes en su fenología. No obstante, cualquier cambio en los factores abióticos podría alterar la dinámica estacional, como el cambio descrito en la fenología de *I. ricinus* en España e Italia como consecuencia del cambio climático (Estrada-Peña y col. 2004b; Dantas-Torres y Otranto 2013). Hay que tener en cuenta, al comparar los datos con los de otros autores, que nuestros datos climáticos se tomaron directamente en cada punto de muestreo, no en estaciones meteorológicas que pueden restar fiabilidad a las conclusiones obtenidas (Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

El análisis de los datos de la dinámica estacional de *H. lusitanicum* en relación con los tres biotopos analizados -olivar, encinar y eucaliptal- (Fig. 1 de la publicación 5.1), confirma que la especie está perfectamente adaptada a la zona de estudio. De los tres biotopos, el olivar presentó un menor número de garrapatas, posiblemente relacionado con las labores agrícolas, siendo el eucaliptal el de mayor abundancia. Es evidente que durante los meses de máxima actividad (de mayo a junio) (Fig. 1 de la publicación 5.1), *H. lusitanicum* busca el resguardo en la hojarasca, y especialmente de los eucaliptos, puesto que puede actuar como amortiguador frente a las altas temperaturas (Requena-García y col. 2017). Este hecho ya ha sido descrito en la bibliografía, donde se ha relacionado la actividad de *I. scapularis* con los árboles caducifolios, debido a la protección que ofrece la hojarasca, más ancha que las acículas de los pinos (Schulze y Jordan 2005).

Por otra parte, además de las características del biotopo, otro factor determinante en la supervivencia de las garrapatas, es su sincronización con el ciclo de los hospedadores (Ginsberg y Zhioua 1996; Ginsberg y col. 2004). Esta asociación ya ha sido descrita en otras especies de garrapatas, como *I. scapularis*, *A. americanum* e *I. ricinus*, donde la presencia de los ciervos parece determinar la distribución de estas garrapatas (Ginsberg y col. 2002, 2004; Tack y col. 2012).

El predominio de adultos de *H. lusitanicum* en ciervos de la Península Ibérica ha sido también señalado por otros autores (Hueli y Díaz-Sáez 1987; García-Romero y col. 2000; San Miguel y col. 2000; Cota Guajardo 2015). A diferencia de otros estudios, donde la actividad de esta especie se describe como estival (García-Romero y col. 2000; San Miguel y col. 2000; Cota Guajardo 2015), con presencias testimoniales en febrero y octubre (Hueli y Díaz-Sáez 1987),

nuestros datos constataron que la parasitación por adultos se mantiene prácticamente todo el año, con cuatro máximos de actividad, en febrero, mayo, agosto y octubre (Fig. 4 de la publicación 5.2). El motivo de esta discrepancia se debe, sin duda, al mayor volumen muestral y al prolongado periodo de estudio del presente trabajo, comparado con los precedentes. La proporción entre sexos fue equilibrada durante todo el año, sin embargo, en los meses fríos se recogieron más machos que hembras, como corresponde a los machos del grupo *Metastriata* (que incluye todos los géneros *Ixodidae*, excepto *Ixodes*), que permanecen sobre el hospedador largos periodos a la espera de hembras (Apanaskevich y Oliver Jr 2014). A la vista de los datos de este estudio, las horas más cálidas del invierno parecen ser suficientes para reactivar a los adultos que permanecen guarecidos en la vegetación, dando lugar a las primeras hembras grávidas del año en febrero. En primavera y verano las temperaturas son óptimas dando lugar a los máximos de mayo y agosto (Fig.4 de la publicación 5.2). En octubre, tiene lugar el último máximo de parasitación, coincidiendo con el agrupamiento de los ciervos durante la berrea, y facilitando que los adultos en búsqueda activa encuentren hospedador más rápidamente, como señalan otros autores (Barnard 1991; Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

Además de adultos, se recogieron larvas y ninfas de *H. lusitanicum* parasitando simultáneamente a los ciervos, a pesar de que el hospedador principal de sus estadíos inmaduros es el conejo silvestre (Estrada-Peña y col. 2004a; Apanaskevich y col. 2008b). Estas observaciones contradicen la supuesta relación entre el tamaño del hospedador y el estadío de la garrapata (Randolph 2014). Quizás, como afirman otros autores (Kiffner y col. 2011), los estadíos inmaduros seleccionan ciertas zonas donde el grosor de la piel les permita la fijación de su aparato bucal.

En cualquier caso, como era de esperar, los conejos fueron los principales hospedadores de los estadíos inmaduros de *H. lusitanicum* con una dinámica similar a la descrita por otros autores (Rodríguez y col. 1981; Cota Guajardo 2015), donde presentaba su actividad desde los últimos meses de primavera hasta el verano, cuando tenía lugar el máximo nivel de parasitación (Fig. 4 de la publicación 5.3). En este tiempo, el calor y la sequía hacen que se detenga la época de celo y la reproducción de estos lepóridos, que permanecen junto a la entrada de la madriguera para airearse, lo que podría favorecer la infestación (Montoya y Mesón 2010a, d). La mayoría de las larvas alimentadas se desprenden de los conejos dentro o cerca de las madrigueras para mudar a ninfas, las cuales pueden así alimentarse rápidamente de los conejos tan sólo un mes

después de las larvas. No obstante, como se ha señalado en la dinámica estacional sobre el ciervo (Fig. 4 de la publicación 5.2), hay una pequeña proporción de estos estadíos inmaduros que se desprende en campo abierto en busca de otros hospedadores; una población que podría garantizar la supervivencia de esta especie en zonas no habitadas por conejos, con las connotaciones epidemiológicas que conlleva.

Con todos los datos obtenidos de las 102 763 garrapatas de la especie *H. lusitanicum* recogidas mensualmente de los distintos biotopos y hospedadores durante los siete años de estudio, se puede definir con cierta garantía su fenología en un ecosistema mesomediterráneo. Así, se confirman los datos previos acerca de que esta especie permanece activa, prácticamente durante todo el año, en uno u otro estadío, sobre animales o en vegetación, si bien su máxima actividad tiene lugar entre marzo y octubre. La búsqueda activa de hospedadores de los adultos de *H. lusitanicum* ocurre, principalmente, en los meses de mayo-junio y septiembre, coincidiendo con los periodos de paridera y berrea de los ciervos. Posiblemente, el comportamiento de encame bajo los árboles y las condiciones de estrés facilita el éxito de la búsqueda activa de las garrapatas y con ello los máximos índices de parasitación encontrados en ciervos en esos periodos. En consecuencia, debido a la continua búsqueda y acceso al hospedador, se desarrollan hembras grávidas cada 2-3 meses, dando lugar a 4 generaciones solapadas durante el año, como se describió previamente (Cota Guajardo 2015):

- La primera generación se inicia en febrero, con la producción de hembras grávidas procedentes de los adultos que se alimentan tras pasar el invierno. Estas hembras grávidas hacen la puesta y las larvas resultantes son responsables de las primeras infestaciones detectadas en conejos en abril, y posteriormente de ninfas en mayo. Los adultos resultantes tras la muda, provocan la máxima población detectada en vegetación en junio, alimentándose y produciendo una nueva generación de hembras grávidas en agosto (la tercera del año), cuyas larvas y ninfas resultantes se alimentarán fundamentalmente en conejo en septiembre. Es posible que estos inmaduros alimentados pasen el invierno en las madrigueras esperando mejores condiciones para alimentarse o mudar, aunque no hay constancia de ello.
- La segunda generación de hembras grávidas se da en mayo, y es responsable de la máxima parasitación por larvas en conejo en julio y por ninfas en agosto. Los adultos

resultantes se encontrarán en la vegetación en septiembre y aquellos que accedan a un ciervo se alimentarán y darán lugar a la última generación de hembras grávidas en octubre. Las más precoces harán la puesta antes del inicio del otoño, pero las más tardías buscarán refugio y esperarán mejores condiciones climáticas para hacer la puesta. Una vez que las hembras se desprenden del hospedador, los machos permanecen sobre él durante el invierno a la espera de nuevas hembras con las que copular. Los adultos que no acceden a un hospedador permanecen en el suelo guarecidos de las condiciones adversas, activándose puntualmente cuando mejoran, pasando así el invierno y produciendo la primera generación de hembras grávidas del año siguiente.

El conocimiento de la fenología de una especie de garrapata en una zona permite definir con cierta garantía de éxito los momentos óptimos de actuación en planes estratégicos de control. En el caso concreto de *H. lusitanicum* en un ecosistema mesomediterráneo, los datos obtenidos definen los momentos y acciones estratégicas según el siguiente patrón:

- El tratamiento para el control de adultos en vegetación debe aplicarse en mayo-junio para obtener el mejor rendimiento.
- El control de la parasitación en ungulados tiene cuatro posibles momentos de actuación: febrero, mayo, agosto y octubre; el principal momento de aplicación debe ser seleccionado en función de las características de cada zona.
- El control de la parasitación de conejos silvestres debería aplicarse, principalmente, en julio-agosto.
- Además, es necesario establecer una serie de medidas personales de prevención, dado el carácter zoonótico de algunos agentes transmisibles.

El éxito del control dependerá, no sólo del momento de aplicación, sino también de la selección de métodos y productos eficaces, como se discutirá más adelante.

6.2. Adaptación de la técnica de alimentación artificial a la especie *Hyalomma lusitanicum*

El sistema de alimentación artificial mediante membranas (MF, del inglés *Membrane Feeding*) de Kröber y Guerin (2007a), modificado en este estudio, ha permitido la obtención de hembras grávidas de *H. lusitanicum*. La tasa de alimentación (40,2 %) fue comparable a estudios similares con otras especies, como *I. scapularis* (38,8 %) o *Dermacentor reticulatus* (49,6 %) (Andrade y col. 2014; Krull y col. 2017). Además, la técnica ha tenido buenos resultados al alimentar adultos de *D. marginatus* e *Ixodes hexagonus*, y larvas de *H. lusitanicum* con resultados preliminares prometedores, aunque la adaptación a estas especies y estadios no está aún completada.

El éxito de esta técnica depende, en parte, de la incorporación de ciertos estímulos específicos que pueden acelerar la compleja secuencia de la alimentación (Waladde y Rice 1982); se ha demostrado, por ejemplo, que la alimentación artificial de *D. reticulatus* mejora significativamente al exponer las garrapatas a un nivel de CO₂ del 5 % (Krull y col. 2017). En nuestro caso se utilizaron los estímulos descritos por Kröber y Guerin (2007a), excepto el pelo de hospedador, que era de ciervo para simular el ciclo de la especie en estudio. Las modificaciones de la técnica fueron el incremento del grosor de la membranas, acorde con la longitud del hipostoma de *H. lusitanicum*; y la utilización de sangre desfibrinada comercial descongelada que permitía desarrollar el experimento de forma práctica y eficaz, a pesar de que otros autores describen un descenso de la tasa de alimentación al utilizar este tipo de sangre (Krull y col. 2017).

En este estudio, al día 5-6 ya se alcanzó una tasa de fijación a la membrana del 70 %, un porcentaje similar al observado en otras especies del género *Hyalomma*, como *H. anatolicum anatolicum* (75 %) e *H. dromedarii* (55 %) (Tajeri y Razmi 2011), aunque inferior al descrito para *I. ricinus* (75-100 %) (Kröber y Guerin 2007a).

El tiempo medio de repleción (11 días) obtenido en la alimentación artificial fue ligeramente más corto al descrito con la misma técnica para otras especies de *Hyalomma*, como *H. anatolicum anatolicum* y *H. dromedarii* (Tajeri y Razmi 2011) (15 y 16 días respectivamente), y de otros géneros, como *I. scapularis* (13 días) (Andrade y col. 2014). Además, este periodo

de alimentación se incluye en los rangos descritos para *H. lusitanicum* en animales de experimentación, como terneros y ovejas (10-17 días, respectivamente) (Ouhelli y Pandey 1984; Ouhelli 1994; Cota Guajardo 2015), así como para otras especies del género: 8-13 días en conejos infestados con *H. dromedarii*, *H. asiaticum*, *H. rufipes* o *H. anatolicum* (Ouhelli 1994; Alahmed y Kheir 2003; Chen y col. 2009, 2012; Ahmed y col. 2011); 7-16 días en terneros infestados con *H. marginatum*, *H. detritum*, *H. dromedarii* o *H. anatolicum excavatum* (Ouhelli 1994); 6-16 días en ovejas infestadas con *H. anatolicum* o *H. rufipes* (Ahmed y col. 2011; Chen y col. 2012); y 10 días en cabras infestadas con *H. anatolicum* (Ahmed y col. 2011).

Nuestros datos confirman que el peso medio de las hembras obtenidas en las alimentaciones artificiales es inferior al observado en las infestaciones naturales (AF, del inglés *Animal Feeding*) o en animales de experimentación (Ouhelli y Pandey 1984; Ouhelli 1994), como ya indicaran Bonnet y Liu (2012) para esta técnica. Este mismo hecho también se ha observado previamente al comparar los resultados de las alimentaciones de *I. scapularis* y *D. reticulatus* sobre animales (Ginsberg y col. 2017b; Šimo y col. 2004), con los de alimentaciones artificiales (Andrade y col. 2014; Krull y col. 2017).

A pesar del menor peso obtenido, las hembras alimentadas MF fueron capaces de continuar el ciclo biológico y realizar la puesta con un éxito del 69 %, un porcentaje muy próximo al 73 % observado en las hembras AF. Incluso el periodo de pre-oviposición fue significativamente más corto en MF (16 días) que en AF (36 días) (Fig. 1 de la publicación 5.4). Ambos periodos se encuentran dentro del rango obtenido en alimentaciones de *H. lusitanicum* sobre animales de experimentación (8-47 días) (Ouhelli y Pandey 1984; Ouhelli 1994; Cota Guajardo 2015). Respecto a la duración de la oviposición-eclosión, en nuestro estudio fue la misma en ambos casos, MF y AF (34 días, Fig. 1 de la publicación 5.4), un tiempo inferior al descrito en los estudios anteriormente citados (38-62 días). Esta diferencia en los tiempos de desarrollo de las fases no parásitas del ciclo podría deberse a la estacionalidad, como se analizará más adelante. La falta de citas previas sobre los porcentajes de eclosión de las puestas procedentes de hembras alimentadas MF no nos permite saber si los datos obtenidos (eclosión del 53 % en MF y del 93 % en AF), se ajustan al rango del desarrollo normal de esta especie.

Se observó una marcada estacionalidad en el éxito de alimentación. Los resultados de las alimentaciones artificiales fueron notablemente mejores en primavera/verano que en

otoño/invierno: mayor porcentaje de hembras grávidas, mayor peso, mejor tasa de oviposición y un menor tiempo de pre-oviposición y oviposición-eclosión. Los resultados del seguimiento de las hembras AF muestran también que la duración de los periodos pre-oviposición y oviposición-eclosión son más cortos en primavera/verano que en otoño/invierno (Fig. 2 de la publicación 5.4). Es un hecho conocido que las condiciones de mantenimiento son determinantes en el desarrollo de las garrapatas (Diehl y col. 1982; Ouhelli 1994); sin embargo, los factores ambientales previos también condicionan el desarrollo posterior, como reflejan los datos post-alimentación de las garrapatas de este estudio, mantenidas en condiciones estándar de laboratorio (25 °C y 85 % HR). Este hecho fue también observado en las alimentaciones experimentales en conejos con la especie *I. scapularis*, donde se describieron ciertas diferencias estacionales entre las garrapatas que habían pasado el invierno y las que estaban recién mudadas (Ginsberg y col. 2017b). Comparando los resultados de preoviposición y oviposición-eclosión de las hembras obtenidas por los dos sistemas MF y AF, se observa un evidente retraso en ambos periodos en los ejemplares alimentados en otoño/invierno con respecto a los de primavera-verano. Teniendo en cuenta que las condiciones de mantenimiento del laboratorio son idénticas en todos los casos, algún factor endógeno debe condicionar dicho efecto. Belozarov (1982) ya describió que las garrapatas tienen unos ciclos rítmicos sincronizados por el fotoperiodo y regulados por factores exógenos y endógenos que marcan el momento para continuar o retrasar el desarrollo de su ciclo biológico.

La técnica de alimentación artificial es una herramienta muy útil para el estudio de la fisiología de las garrapatas y permite trabajar limitando el uso de los animales de experimentación. No obstante, requiere mucho trabajo de manufactura de los viales y del control de las alimentaciones cada 12 horas, además de un alto coste económico. Actualmente, las investigaciones se están centrando en conseguir la automatización del sistema, proponiendo nuevos dispositivos que mejoren la alimentación artificial. Entre ellas, se encuentra el sistema semi-automatizado de Böhme y colaboradores (2018), que reduce la carga del trabajo experimental, pero requiere un gran volumen de sangre debido al flujo constante de sangre a través del sistema diseñado. En cualquier caso, la adaptación de la técnica de alimentación artificial a nuevas especies es importante para investigar las facetas básicas de su biología, la competencia vectorial y nuevas estrategias de control, así como los posibles mecanismos de resistencia a pesticidas (Groff y Bishop 2017; Romano y col. 2018).

6.3. Control de la Población de Garrapatas Mesomediterráneas

La superpoblación de garrapatas supone un problema complejo de difícil abordaje. Actualmente se considera imposible la erradicación y se opta por reducir la población hasta límites tolerables mediante un sistema que aplique distintos métodos de control en momentos estratégicos del ciclo. Se proponen dos alternativas ecológicas, dentro de un programa para el control integrado de una superpoblación de garrapatas en condiciones silvestres. La primera medida, de control biológico, consiste en la aplicación de un agente natural infectante para las garrapatas, un hongo entomopatógeno ampliamente utilizado en agricultura ecológica para el control de plagas (Samish y Rehacek 1999; Fernández y col. 2005; White y Gaff 2018). La segunda medida rescata una práctica más tradicional, como es la exclusión de ungulados, principal hospedador de los estadios adultos de la garrapata objeto de estudio.

Hongos entomopatógenos

En este estudio se documenta el primer trabajo sobre la eficacia del control de la infestación por garrapatas en conejos silvestres mediante la aplicación de una cepa comercial de *B. bassiana* (Botanigard®) con sopladora en madrigueras.

Como control positivo se utilizó la cipermetrina, un producto de reconocida eficacia frente a las infestaciones por garrapatas (Petro y col. 2012), como demuestran los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 1 y Fig. 2 de la publicación 5.5). Dadas las características del producto, con una vida media corta sobre el follaje (5 días) y una rápida descomposición en suelo (NPTN 1998), el tratamiento resultó eficaz a corto plazo. Por ello, bajo estas condiciones, la cipermetrina aplicada con esta novedosa metodología podría ser una buena medida para controlar garrapatas en condiciones de campo, si se administra cuando el índice de parasitación del conejo es máximo.

La aplicación de soluciones acuosas de conidios de una cepa comercial de *B. bassiana* (Botanigard®) en madrigueras resultó eficaz para el control de la parasitación de garrapatas en conejos silvestres, en general, y frente a *H. lusitanicum* en particular; y, además, el efecto persistía al menos dos meses. Como se esperaba, la eficacia en condiciones de campo de *B. bassiana* fue menor que la obtenida en otros ensayos de laboratorio (Kaaya et al. 1996; Campos et al. 2010). No obstante, la reducción de la parasitación por garrapatas de este trabajo fue

mayor que la obtenida en otros estudios con el mismo hongo entomopatógeno sobre otras especies de garrapatas (Campos et al. 2010). Esta eficacia podría estar relacionada con el método de administración, es decir, la aplicación con sopladora en el interior de las madrigueras, donde se mantienen unas condiciones atenuadas de temperatura y humedad (Gálvez-Bravo 2011), y se evita la radiación solar que reduce la viabilidad de los conidios *B. bassiana*. Esta hipótesis se respalda con la existencia de numerosos estudios que documentan el efecto de las condiciones medioambientales sobre la eficacia ixodocida del hongo (Zimmermann 2007; Cradock y Needham 2011b; D'Alessandro y col. 2012; Eisen y Dolan 2016). Al aplicar el producto directamente en las madrigueras, no es necesario prevenir los efectos climáticos adversos que requieren la administración de un hongo entomopatógeno. Sin embargo, a pesar de que el tipo de aplicación limitó parte del efecto de la climatología, no lo eliminó completamente, lo que podría justificar la diferencia de eficacia entre los dos ensayos realizados. Los resultados sugieren que en ecosistemas mesomediterráneos la eficacia de la aplicación de los conidios de *B. bassiana* no sólo debe tener en cuenta la fenología de las garrapatas, sino también las condiciones del clima, siendo más eficaz en primavera, cuando no se sobrepasan los 29,4 °C (como recomienda el fabricante). Por el contrario, y aunque el índice de parasitación de los conejos recomienda su aplicación en verano, debido a las condiciones extremas (altas temperaturas y baja humedad, Fig.1 de la publicación 5.5), la eficacia se reduce, probablemente, por la disminución de la viabilidad de los conidios. La aplicación en las entradas de las madrigueras es, no obstante, muy laboriosa, por lo que el equipo sigue trabajando en nuevos métodos de aplicación. Así, por ejemplo, se ha adaptado la metodología utilizada por Pound y colaboradores (2000) en el control de *I. scapularis* para la administración de amitraz en comederos de corzos y, además, el equipo ha diseñado un dispositivo por contacto en los comederos de los conejos que aplica el hongo tópicamente, pero los resultados de esta medida aún son preliminares (Valcárcel 2017).

Es preciso aclarar que, dada la dinámica estacional de las garrapatas de la zona de estudio, los datos obtenidos en septiembre (día 90) no son concluyentes, debido a la disminución natural de *H. lusitanicum* y a al inicio del periodo de actividad de otras especies, como *Ha. hispanica* y *R. pusillus*. Los resultados del ensayo preliminar muestran, curiosamente, que, al comparar los resultados de las dos diluciones aplicadas, la solución diluida fue más efectiva que la concentrada (Tabla 1 y Fig. 2 de la publicación 5.5). La explicación de este resultado podría estar relacionada con la dificultad de aplicar la solución concentrada homogéneamente con la

sopladora, por obturación parcial de la boquilla dosificadora. Al analizar los buenos resultados obtenidos hay que tener en cuenta que en el ensayo se utilizó una solución acuosa para valorar estrictamente la eficacia de la cepa, y que sería posible incrementar su concentración utilizando otras formulaciones, como señalan otros autores (Samish y col. 2008). De esta forma, los resultados podrían mejorarse si en lugar de una suspensión acuosa se utilizara una formulación con aceite (Angelo y col. 2010b), ya que se aumentaría la adherencia de los conidios al follaje (Reis y col. 2008). Algunos autores sugieren también que es más eficaz combinar el tratamiento con la aplicación de acaricidas (Webster y col. 2015), pero hay que tener en cuenta que algunos acaricidas podrían ser tóxicos para el hongo (Barci y col. 2009). La experiencia del equipo en este sentido, sugiere que los hongos entomopatógenos aplicados en madrigueras podrían complementarse con la adición de espinosinas en el trigo o pienso de los comederos de los conejos silvestres (González 2015).

Exclusión de ungulados

La reducción de hospedadores ha sido una técnica de manejo utilizada en el control de *I. scapularis* en el nordeste de Estados Unidos (White y Gaff 2018). En este estudio se propuso analizar si la medida podría ser eficaz también para *H. lusitanicum*, limitando su acceso a determinadas zonas, sin sacrificar a los animales. Para ello, se dispuso de dos áreas semejantes en todas las variables (clima, superficie, fauna de pequeños animales, vegetación, estacionalidad, etc.), excepto en la presencia de ungulados. A pesar de que la abundancia de ungulados suele dificultar la consolidación de nuevas poblaciones de conejos (Pérez de Ayala 2017), estos animales eran extremadamente abundantes en ambas zonas, si bien aparentemente había una mayor densidad en el área vallada.

La ixodifauna encontrada en el área vallada podría considerarse una distribución normal en conejos que habitan zonas sin grandes mamíferos, como se ha descrito anteriormente en la Península Ibérica (Rodríguez 1980; Soriguer 1980b; Rodríguez y col. 1981; Márquez 1993). Sin embargo, en el área abierta, los ungulados jugaron un papel importante como hospedadores principales o alternativos para estas especies de garrapatas. Se encontró, por tanto, una clara diferencia entre la distribución de la ixodifauna de ambas áreas (Fig. 1 de la publicación 5.6). Especialmente en el caso de *H. lusitanicum*, donde el ciervo es el hospedador principal para los estadios adultos en muchos ecosistemas mediterráneos (Hueli y Díaz-Sáez 1987; Valcárcel y col. 1999; García-Romero y col. 2000). Como se ha señalado en la fenología, *H. lusitanicum*

permanece activa todo el año, buscando hospedador y/o alimentándose sobre ciervos (publicaciones 5.1 y 5.2). Esta supervivencia de los adultos explica por qué se encontró una gran abundancia de estadíos inmaduros alimentándose sobre conejos en el área abierta (Fig. 2a de la publicación 5.6).

Para otras especies de garrapatas, cuyo hospedador principal es el conejo, como *R. pusillus* (Márquez y Jiménez Millán 1988; Márquez 1989) o *Ha. hispanica* (Márquez 1992), la exclusión de los ciervos no afecta directamente a su ciclo biológico. La mayor abundancia de estas especies en el área vallada (Fig. 2b de la publicación 5.6), podría estar relacionada con la mayor densidad de conejos, pero también podría influir la disminución en número de *H. lusitanicum* por la falta de ungulados. El elevado índice de parasitación de *R. bursa* en el área vallada fue sorprendente, puesto que es una especie que se alimenta principalmente en ovejas, caballos y ungulados silvestres; si bien sus estadíos inmaduros pueden parasitar también conejos (Estrada-Peña y col. 2004a), aunque hay pocas referencias al respecto (Rodríguez y col. 1981; Márquez y Guiguen 1992). De esta forma, se documenta la posible competencia interespecífica de las garrapatas en el conejo, como describieran Horak y Fourie (1991) para *Hyalomma rufipes* e *H. truncatum* en liebres. Las pocas citas que hacen referencia a la restricción de la población de una especie de garrapata por la competencia con otra, se limitan al continente africano, donde, por ejemplo, *Boophilus decoloratus* ha sido casi reemplazada por *R. (B.) microplus* en Zambia, y la distribución geográfica de *Amblyomma hebraeum* parece limitada por la competencia interespecífica con *A. variegatum* (Berkvens y col. 1998; Walker y col. 2003; Estrada-Peña y col. 2008b).

El nivel de parasitación por garrapatas en los hospedadores depende de muchas variables, como la estacionalidad y los factores de clima y espacio, incluyendo la disponibilidad del hospedador principal para cada estadío (Brunner y Ostfeld 2008). Estos factores actúan en conjunto normalmente, pero un cambio específico podría influir en la abundancia de un sólo estadío y, por consiguiente, en la continuación del ciclo biológico (White y Gaff 2018). En nuestro estudio, se ha relacionado la abundancia de *H. lusitanicum* en el área abierta con la presencia de los ciervos, por lo que es razonable asumir que el bajo número encontrado en el área vallada, tanto en vegetación (Cota Guajardo 2015) como en los conejos examinados, se deba al progresivo descenso después de la instalación de la barrera. Estudios similares han descrito sólo

reducciones temporales en ninfas de *A. americanum* después de excluir a los ciervos, ya que las garrapatas encontraban fácilmente hospedadores alternativos en la zona (Ginsberg y col. 2002). Los mamíferos de tamaño medio y pequeño pueden servir como hospedadores alternativos en esos casos (Daniels y Fish 1995; Ruiz-Fons y Gilbert 2010); en nuestro caso, el hipostoma de los adultos de *H. lusitanicum* provoca importantes lesiones en conejos, como se ha observado en infestaciones experimentales (Cota Guajardo 2015), por lo que, previsiblemente, no se produce de forma natural con mucha frecuencia. A la vista de los resultados obtenidos, la ausencia de ungulados en una zona es un potente factor limitante de la presencia de *H. lusitanicum*, y una medida eficaz para el control de su población.

Por tanto, la limitación de la población de cérvidos puede ser eficaz como medida de control a pequeña escala (Hofmeester y col. 2017), siendo además una medida recomendada para la conservación ambiental (Millins y col. 2017), sin embargo, no puede ser la única medida, y debe contemplar las posibles implicaciones de otras garrapatas y hospedadores (Perkins y col. 2006; Ostfeld y col. 2006; Jordan y col. 2007).

El control de las garrapatas mesomediterráneas en general y de *H. lusitanicum* en particular, es un proceso complejo que requiere tener en cuenta factores bióticos y abióticos, y un diseño específico de acuerdo a las características y posibilidades de la zona. En el caso concreto del control de *H. lusitanicum* en la finca “La Garganta”, se propone una acción integrada en distintos momentos del ciclo, sobre diferentes dianas, y con distintos métodos. Sin ningún otro condicionante económico ni de gestión, y con la experiencia del grupo en este campo, el plan propuesto incluiría los siguientes pasos: El control de la población de garrapatas adultas en vegetación con productos ecológicos, como el ácido oxálico (3-10 %) en mayo-junio (Olmeda y col. 2008; Valcárcel y col. 2014); la aplicación de un tratamiento ixodicida a los ciervos en febrero, mayo, agosto y octubre, limitando el acceso de estos animales a determinadas zonas (publicación 5.6); y finalmente, la aplicación de conidios de hongos entomopatógenos en conejeras en abril-mayo (publicación 5.5) y la adición de espinosinas en los comederos de los conejos en julio y agosto (González 2015). Además de la recomendación de una serie de medidas preventivas para el personal que se encuentre en riesgo de infestación por garrapatas.

7. Conclusiones

1. La garrapata *H. lusitanicum*, la especie exófila más abundante en la zona centro peninsular, constituye una población estable, está perfectamente adaptada al ecosistema mesomediterráneo, condicionada por la densidad de sus hospedadores, siendo capaz de desplazar a otras especies de garrapatas.
2. Los adultos de *H. lusitanicum* se mantienen activos prácticamente durante todo el año, constituyendo un riesgo de infestación para los animales y el ser humano de febrero a noviembre, con máxima exposición en mayo y junio.
3. Las infestaciones por adultos de *H. lusitanicum* en ciervos presentan máximos en febrero, mayo, agosto y octubre, y, por otra parte, los estadios inmaduros parasitan preferentemente a los conejos silvestres de abril a septiembre con máximos en julio y agosto; en contra de lo descrito, en este momento de máxima actividad de larvas y ninfas, también los ciervos presentan parasitaciones por inmaduros.
4. El control de la especie *H. lusitanicum* es especialmente complejo, al ser capaz de producir hasta 4 generaciones solapadas de febrero a octubre, pudiendo encontrarse, en un mismo momento, distintos estadios de desarrollo parasitando diferentes hospedadores o a la búsqueda de los mismos. Por ello, es necesario establecer un programa de control integrado que actúe en distintos momentos del ciclo con medidas que no alteren el equilibrio natural.
5. La aplicación dentro de las madrigueras del hongo entomopatógeno, *B. bassiana*, puede ser considerada como una alternativa ecológica y eficaz para el control de garrapatas en los conejos silvestres en campo, ya que ha permitido reducir el nivel de infestación hasta dos meses después de la administración.
6. El riesgo de infestación puede reducirse mediante medidas de manejo de hospedadores; la exclusión del ungulado hospedador de los estadios adultos de *H. lusitanicum*, el ciervo en la zona de estudio, repercute decisivamente en la población de esta especie.
7. Se propone un programa de control integrado para la garrapata mesomediterránea, *H. lusitanicum*, desarrollado específicamente de acuerdo a la gestión ecológica de una finca cinegética. Entre las medidas propuestas, destaca la reducción del riesgo de infestación

y la interrupción del ciclo en momentos estratégicos. Las actuaciones a adoptar para reducir el riesgo serían la aplicación de un producto ecológico, como el ácido oxálico, en zonas de paso en mayo y junio, y la exclusión de hospedadores en lugares concretos. Para interrumpir el ciclo se propone la aplicación de tratamiento ixodicida a los ciervos, preferentemente en febrero, mayo, agosto y octubre; mientras que la parasitación de conejos se controlaría mediante la aplicación de una solución de conidios de *B. bassiana* en conejeras en abril y mayo, complementada con la administración en los comederos de espinosinas en julio y agosto.

8. Se ha conseguido completar artificialmente la alimentación de adultos de *H. lusitanicum* hasta la obtención de hembras grávidas viables, mediante la adaptación de la técnica de Kröber y Guerin. Este sistema permite obtener información sobre la fisiología de esta especie; el establecimiento de colonias homogéneas libres de patógenos y la estandarización de métodos de cribado de productos para su control.

8. Resumen y *Abstract*

Biología y Control de la Garrapata *Hyalomma lusitanicum*

La incidencia y distribución geográfica de las enfermedades transmitidas por vectores ha aumentado en las últimas décadas como consecuencia de un proceso multifactorial que incluye el cambio climático, ecológico y social, lo que condiciona el mayor riesgo de exposición a los vectores. Entre éstos, destacan las garrapatas, que son el principal vector biológico en sanidad animal. Es tan elevado el grado de adaptación de los agentes a su garrapata-vector, y de ésta a sus hospedadores y al medio, que es muy difícil establecer una única medida que evite el riesgo de transmisión. Una de las medidas de prevención de las enfermedades transmitidas es el control de los vectores que, hoy en día, sugiere la necesidad de establecer un control integrado combinando distintas estrategias para lograr mantener el riesgo dentro de un límite razonable. Dado que las referencias específicas del control de garrapatas mesomediterráneas son escasas y parciales, nos propusimos abordar su control. El estudio se desarrolló en una finca cinegética de gestión ecológica, y se centró en *Hyalomma lusitanicum*, una especie que ya habíamos determinado como la de mayor riesgo en el área de estudio, a través de los siguientes objetivos: (1) identificar los momentos estratégicos de control según su fenología en la vegetación y los hospedadores habituales; (2) desarrollar un método artificial de alimentación en condiciones de laboratorio; (3) diseñar un nuevo sistema de aplicación de productos en condiciones de campo; y (4) evaluar la eficacia de estrategias de control compatibles con la gestión ecológica.

Los resultados confirman la estabilidad de la población de *H. lusitanicum* en la zona y su perfecta adaptación al ecosistema mesomediterráneo, donde encuentra refugio y hospedadores adecuados; además, esta garrapata es capaz de desplazar a otras especies. Los adultos se mantienen activos prácticamente durante todo el año, con amplio riesgo de infestación (búsqueda activa en vegetación), desde febrero a noviembre, y la máxima exposición en mayo y junio. La parasitación de los ciervos por adultos tiene lugar a lo largo de todo el año, con grandes fluctuaciones, con máximos niveles de infestación observados en febrero, mayo, agosto y octubre. Los estadios inmaduros parasitan preferentemente a los conejos de abril a septiembre, con máximos en julio y agosto; y, en contra de lo descrito hasta ahora, hemos observado que tanto larvas como ninfas son capaces de infestar a los ciervos. A lo largo del año se inician, al menos, cuatro generaciones de garrapatas que se pueden alimentar sin problemas en una gran variedad de hospedadores y en biotopos muy diferentes, lo que complica enormemente su control.

La adaptación de la técnica de Kröber y Guerin para la alimentación artificial de adultos de *H. lusitanicum* hasta la obtención de hembras grávidas viables, nos ha permitido obtener una valiosa información sobre la fisiología de esta especie. Este hito será, previsiblemente, el punto de partida de futuros estudios de eficacia de productos *in vitro* o de capacidad vectorial, entre otros. En relación con el trabajo de campo, la aplicación dentro de las madrigueras del hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana*, redujo el nivel de infestación en los conejos hasta dos meses después de la administración. La exclusión de los ciervos también redujo significativamente la población de *H. lusitanicum* en los conejos en la zona de estudio.

En resumen, para el control integrado, se proponen dos líneas de trabajo complementarias, (1) la reducción del riesgo de infestación por esta garrapata mesomediterránea, y (2) la interrupción del ciclo en momentos estratégicos. Las actuaciones a adoptar para reducir el riesgo serían la aplicación de un producto ecológico, como el ácido oxálico, en zonas de paso en mayo y junio, y la exclusión de hospedadores en lugares concretos. Para interrumpir el ciclo se propone la aplicación de un tratamiento ixodicida a los ciervos, preferentemente en febrero, mayo, agosto y/o octubre; mientras que la parasitación de los conejos se controlaría mediante la aplicación de una solución de conidios de *B. bassiana* en conejeras en abril y mayo, complementada con la administración de espinosinas en pienso en julio y agosto. El objetivo final de este plan a largo plazo, no es en ningún caso la eliminación de la especie objeto de control, sino mantener la población en equilibrio con su hábitat.

Biology and Control of the *Hyalomma lusitanicum* Tick

In the last decades, the incidence and geographical distribution of vector-borne diseases transmitted have increased due to a multifactorial process that includes climate, ecological and social changes, what causes a higher risk of exposure to vectors. Ticks stand out among them, since they are the main biological vector in animal health. The adaptation of the pathogens to their tick-vector, hosts and the environment, is so high that it is very difficult to establish a single measure that avoids the risk of transmission. One of the measures for the prevention of transmitted diseases is the control of vectors, which nowadays suggests the need to establish an integrated control combining different strategies to maintain the risk within a reasonable limit. References about specific control of meso-Mediterranean ticks were scarce and partial, thus we proposed to address their control. Study was developed in a natural reserve with hunting activity

and ecological management, focusing on *Hyalomma lusitanicum*, a species that is already determined as the greatest risk in the study area, through the following objectives: (1) to identify the strategic moments to control of meso-Mediterranean ticks through the description of their phenology in its vegetation and hosts; (2) to develop an alternative method of feeding *H. lusitanicum* under laboratory conditions; (3) to design a new application system for tick control in field conditions and (4) to evaluate the effectiveness of control strategies compatible with the ecological management of natural spaces.

The results confirm that *H. lusitanicum* constitute a stable population in the study area, perfectly adapted to the meso-Mediterranean ecosystem, where it finds a suitable shelter and hosts; moreover, this tick can displace other species. *H. lusitanicum* adults are active throughout the year, with a wide risk of infestation (active host-seeking), from February to November, with maximum exposure in May and June. The infestation by adult ticks in red deer is observed, with large fluctuations and maximum levels in February, May, August and October. Its immature stages feed on mostly wild rabbits from April to September with maximums in July and August. In contrast to other authors, we have observed that larvae and nymphs can feed on red deer. Throughout the year, at least four generations overlapped begin and can be fed in a great variety of hosts in different biotopes, what complicates their control.

The adaptation of the Kröber and Guerin technique for the artificial feeding of *H. lusitanicum* adults to get viable gravid females has allowed us to obtain valuable information about the physiology of this species. This milestone will be predictably the starting point of future efficacy studies of *in vitro* products or vector capacity, among others. In relation to the field trials, the application within the burrows of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, reduced the level of infestation in rabbits until two months after administration. The exclusion of deer also significantly reduced the population of *H. lusitanicum* in rabbits in the study area.

In summary, for the integrated control, we proposed two complementary lines of work: (1) the reduction of the risk of infestation by this meso-Mediterranean tick, and (2) the interruption of the cycle at strategic moments. The actions to reduce the risk would be to apply an ecological product, such as oxalic acid, in areas of passage in May and June, and the exclusion of hosts in specific places. To interrupt the cycle, we propose the application of an ixodicide treatment to red deer, ideally in February, May, August and/or October, while the parasitization of wild

rabbits is controlled with the administration of a solution of conidia of *B. bassiana* in burrows in April and May, supplemented with the application of spinosyns on feeders in July and August. The final objective of this long-term program is not to eliminate the tick species under control, but to maintain the population in balance with its habitat.

9. Bibliografía

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., e Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203(1-2): 6-20.
- Abdigoudarzi, M., Esmaeilnia, K., y Shariat, N. (2009). Laboratory study on biological control of ticks (Acari: Ixodidae) by entomopathogenic indigenous fungi (*Beauveria bassiana*). *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 3(2): 36-43.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2018). Resumen de Salud Pública: Piretrinas y piretroides (Pyrethrins and Pyrethroids). Consultada el 3 de agosto de 2018, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs155.html
- Ahmed, B. M., Taha, K. M., y Hussein, A. M. E. (2011). Life cycle of *Hyalomma anatolicum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) fed on rabbits, sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 177(3-4): 353-358.
- Alahmed, A. M., y Kheir, S. M. (2003). Life cycle and survival of *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Agricultural and Marine Sciences*, 8(1): 11-14.
- Allan, B. F. (2009). Influence of Prescribed Burns on the Abundance of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in the Missouri Ozarks. *Journal of Medical Entomology*, 46(5): 1030-1036.
- Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H., y Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(2): 105-113.
- Anderson, J. F., y Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2): 195-215.
- Andrade, J. J., Xu, G., y Rich, S. M. (2014). A Silicone Membrane for *in vitro* Feeding of *Ixodes scapularis* (Ixodida: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 51(4): 878-879.
- Angelo, I. C., Gôlo, P. S., Camargo, M. G., Kluck, G. E. G., Folly, E., y Bittencourt, V. R. E. P. (2010a). Haemolymph Protein and Lipid Profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Infected by Fungi: Protein and Lipid Profile of *R. microplus* Infected by Fungi. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(1-2): 79-83.
- Angelo, I. C., Fernandes, É. K. K., Bahiense, T. C., Perinotto, W. M. S., Moraes, A. P. R., Terra, A. L. M., y Bittencourt, V. R. E. P. (2010b). Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 172(3-4): 317-322.

- Angelo, I. C., Gôlo, P. S., Perinotto, W. M. S., Camargo, M. G., Quinelato, S., Sá, F. A., Pontes, E. G., Bittencourt, V. R. E. P. (2013). Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections. *Parasitology Research*, 112(2): 501-509.
- Apanaskevich, D. A., Schuster, A. L., y Horak, I. G. (2008a). The genus *Hyalomma*: VII. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) dromedarii* and *H. (E.) schulzei* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 45(5): 817-831.
- Apanaskevich, D. A., Santos-Silva, M. M., y Horak, I. G. (2008b). The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia Parasitologica*, 55(1): 61-74.
- Apanaskevich, D. A., y Oliver Jr, J. H. (2014). Life Cycles and Natural History of Ticks. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 1, pp. 59-74). Oxford University Press, New York.
- Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobinurie bacterienne boeuf. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 107: 692-694.
- Bailey, K. P. (1960). Notes on the Rearing of *Rhipicephalus appendiculatus* and their infection with *Theileria parva* for Experimental Transmission. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 8: 33-43.
- Bajer, A., Rodo, A., Alsarraf, M., Dwużnik, D., Behnke, J. M., y Mierzejewska, E. J. (2017). Abundance of the tick *Dermacentor reticulatus* in an ecosystem of abandoned meadows: Experimental intervention and the critical importance of mowing. *Veterinary Parasitology*, 246: 70-75.
- Balashov, Y. S. (2006). Types of parasitism of acarines and insects on terrestrial vertebrates. *Entomological Review*, 86(8): 957-971.
- Barandika, J. F., Hurtado, A., Garcia-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral, M., Jado, I., Juste, R. A., Anda, P., y García-Pérez, A. L. (2007). Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Wild and Domestic Small Mammals in Northern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19): 6166-6171.
- Barandika, J. F., Olmeda, S. A., Casado-Nistal, M. A., Hurtado, A., Juste, R. A., Valcárcel, F., Anda, P., y García-Pérez, A. L. (2011). Differences in questing tick species distribution between Atlantic and Continental climate regions in Spain. *Journal of Medical Entomology*, 48(1): 13-19.

- Barandika Iza, J. F. (2012). *Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: Estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos*. Universidad del País Vasco, Vitoria-Gasteiz.
- Barci, L. A. G., de Almeida, J. E. M., Nogueira, A. H. de C., y do Prado, A. P. (2009). Determinação da CL90 e TL90 do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(e1): 34-39.
- Barker, S. C., y Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129(7): S15-S36.
- Barnard, D. R. (1991). Mechanisms of Host-Tick Contact with Special Reference to *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Beef Cattle Forage Areas. *Journal of Medical Entomology*, 28(5): 557-564.
- Barreda Fontes, J. M., y Martínez Guijarro, J. L. (2009). Decreto 10/2009 por el que se declara el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) como especie cinegética de interés preferente y se aprueba el Plan General de la especie en Castilla-La Mancha. Diario Oficial de Castilla-La Mancha Número 30, Sección 1.6.3. Modalidades de Caza para el Conejo.
- Basco, P. I., Carballedo, A. D., Cota-Guajardo, S. C., Olmeda, A. S., y Valcárcel, F. (2008). Estudio de control biológico de garrapatas en la finca “La Garganta”. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(2): 73-84.
- Belozarov, V. N. (1982). Diapause and Biological Rhythms in Ticks. En F. D. Obenchain y R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks* (Vol. 1, pp. 469-496). Pergamon Press, Oxford.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., y Mehlhorn, H. (2016). Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? *Parasitology Research*, 115(7): 2545-2560.
- Benjamin, M. A., Zhioua, E., y Ostfeld, R. S. (2002). Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39: 723-728.
- Berkvens, D. L., Geysen, D. M., Chaka, G., Madder, M., y Brandt, J. R. (1998). A survey of the ixodid ticks parasitising cattle in the Eastern Province of Zambia. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(3): 234-240.

- Bissinger, B. W., y Roe, R. M. (2010). Tick repellents: Past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(2): 63-79.
- Böhme, B., Krull, C., Clausen, P.-H., y Nijhof, A. M. (2018). Evaluation of a semi-automated *in vitro* feeding system for *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* adults. *Parasitology Research*, 117(2): 565-570.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (1996). Real Decreto 2210/1995 por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica. Número 21, *Sección I*.
- Boletín Oficial del Estado (BOE). (2013). Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Número 34, *Sección I*.
- Bonnet, S., y Liu, X. Y. (2012). Laboratory artificial infection of hard ticks: a tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission. *Acarologia*, 52(4): 453-464.
- Bowman, A. S., Ball, A., y Sauer, J. R. (2008). Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. En A. S. Bowman y P. Nuttall (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control* (pp. 73-91). Cambridge University Press, Cambridge.
- Brunner, J. L., y Ostfeld, R. S. (2008). Multiple causes of variable tick burdens on small-mammal hosts. *Ecology*, 89(8): 2259-2272.
- Burg, R. W., Miller, B. M., Baker, E. E., Birnbaum, J., Currie, S. A., Hartman, R., Kong, Y.-L., Monaghan, R. L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J. B., Wallick, H., Stapley, E. O., Oiwa, R., y Omura, S. (1979). Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3): 361-367.
- Butler, J. F. (1991). Current status and recent advances in rearing and sampling of ticks. En F. W. Knapp (Ed.) (pp. 87-94). Presentado en *First Symposium on Ectoparasites of Pets*, University of Kentucky, Kentucky.
- Cafarchia, C., Immediato, D., Iatta, R., Ramos, R., Lia, R., Porretta, D., Figueredo, L., Dantas-Torres, F., y Otranto, D. (2015). Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Parasites and Vectors*, 8(1): 80-86.
- Calvete Margolles, C. (1999). *Epidemiología de enfermedad hemorrágica (VHD) y mixomatosis en el conejo silvestre (Oryctolagus cuniculus L. 1758) en el valle medio del Ebro: modelización de VHD y herramientas de gestión*. Universidad de Zaragoza, Zaragoza.

- Campos, R. A., Boldo, J. T., Pimentel, I. C., Dalfovo, V., Arajo, W. L., Azevedo, J. L., Vainstein, M. H., y Barros, N. M. (2010). Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research*, 9(3): 1421-1430.
- Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Pascoli, M., de Lima, R., y Fraceto, L. F. (2016). Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. *Frontiers in Plant Science*, 7(1494): 1-8.
- Carpio, A. J., Guerrero-Casado, J., Ruiz-Aizpurua, L., Vicente, J., y Tortosa, F. S. (2014). The high abundance of wild ungulates in a Mediterranean region: is this compatible with the European rabbit? *Wildlife Biology*, 20(3): 161-166.
- Carranza, J. (1986). Configuración espacial de los grupos mixtos en el ciervo (*Cervus elaphus* L.) durante el periodo de celo. *Miscellania zoológica*, 10: 347-352.
- Carranza, J., de Trucios, S. J. H., Medina, R., Valencia, J., y Delgado, J. (1991). Space use by red deer in a Mediterranean ecosystem as determined by radio-tracking. *Applied Animal Behaviour Science*, 30(3-4): 363-371.
- Carranza, J., y Valencia, J. (1992). Organización social del ciervo en hábitat mediterráneo. *Miscellania zoológica*, 16: 223-232.
- Carranza, J. (2017). Ciervo – *Cervus elaphus* (Linnaeus, 1758). En A. Salvador e I. Barja (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles* (p. 34). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Recuperado de <http://www.vertebradosibericos.org>
- Carroll, J. F., y Schmidtman, E. T. (1992). Tick Sweep: Modification of the Tick Drag-Flag Method for Sampling Nymphs of the Deer Tick (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 29(2): 352-355.
- Carroll, J. F., Mills, G. D., y Schmidtman, E. T. (1996). Field and laboratory responses of adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) to kairomones produced by white-tailed deer. *Journal of Medical Entomology*, 33(4): 640-644.
- Carroll, J. F. (2002). How Specific are Host-Produced Kairomones to Host-Seeking Ixodid Ticks? *Experimental and Applied Acarology*, 28(1-4): 155-161.
- Casida, J. E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 34: 189-202.
- Castellà, J. (2002). Parasitosis del conejo. Parasitosis cutáneas: Ixodidosis. En M. Cordero del Campillo y F. A. Rojo-Vázquez, *Parasitología Veterinaria* (pp. 750-751). McGraw-Hill, Madrid.

- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2018a). Especiales CDC. Enfermedades y afecciones: Detenga las garrapatas. Consultada el 2 de agosto de 2018, de <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/garrapatasprevencion/index.html>
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2018b). Preventing Tick Bites on People. Consultada el 12 de agosto de 2018, de https://www.cdc.gov/lyme/prev/on_people.html
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2018c). Preventing Tick Bites. Natural Tick Repellents and Pesticides. Consultada el 13 de agosto de 2018, de <https://www.cdc.gov/lyme/prev/natural-repellents.html>
- Chabaud, A. G. (1950). Sur la Nutrition Artificielle des Tiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 25(1-2): 42-47.
- Chen, Z., Yu, Z., Yang, X., Zheng, H., y Liu, J. (2009). The life cycle of *Hyalomma asiaticum kozlovi* Olenov, 1931 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 160(1-2): 134-137.
- Chen, Z., Li, Y., Liu, Z., Yang, J., y Yin, H. (2012). The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 56(1): 85-92.
- Chitimia-Dobler, L., De Araujo, B. C., Ruthensteiner, B., Pfeffer, T., y Dunlop, J. A. (2017). *Amblyomma birmittum* a new species of hard tick in Burmese amber. *Parasitology*, 144(11): 1441-1448.
- Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zając, V., y Dutkiewicz, J. (2012). Repellents and acaricides as personal protection measures in the prevention of tick-borne diseases. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(4): 625-630.
- Clymer, B. C., Howell, D. E., y Hair, J. A. (1970). Environmental Alteration in Recreational Areas by Mechanical and Chemical Treatment as a Means of Lone Star Tick Control. *Journal of Economic Entomology*, 63(2): 504-509.
- Cordero del Campillo, M., Castañón-Ordoñez, L., y Reguera-Feo, A. (1994). *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos* (Segunda Edición, p. 650). Secretariado de Publicaciones, Universidad de León, León.
- Cota Guajardo, S. C. (2015). *Control Biológico e Integrado de la Garrapata Hyalomma lusitanicum en Explotaciones Silvo-Agro-Cinegéticas de Ecosistema Meso-Mediterráneo*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

- Cradock, K., y Needham, G. (2011a). Physiological effects upon *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) infected with *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Experimental and Applied Acarology*, 53(4): 361-369.
- Cradock, K. R., y Needham, G. R. (2011b). *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a management agent for free-living *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Ohio. *Experimental and Applied Acarology*, 53(1): 57-62.
- Cully, J. F. (1999). Lone Star Tick Abundance, Fire, and Bison Grazing in Tallgrass Prairie. *Journal of Range Management*, 52(2): 139-144.
- D'Alessandro, W. B., Humber, R. A., y Luz, C. (2012). Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2): 156-159.
- Daniels, T. J., y Fish, D. (1995). Effect of Deer Exclusion on the Abundance of Immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Parasitizing Small and Medium-Sized Mammals. *Journal of Medical Entomology*, 32(1): 5-11.
- Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Capelli, G., y Otranto, D. (2013). Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Experimental and Applied Acarology*, 61(1): 119-127.
- Dantas-Torres, F., y Otranto, D. (2013). Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* on ground level and higher vegetation in a preserved wooded area in southern Europe. *Veterinary Parasitology*, 192(1-3): 253-258.
- Dantas-Torres, F. (2015). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3): 452-461.
- Davey, R. B., y George, J. E. (2002). Efficacy of macrocyclic lactone endectocides against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested cattle using different *pour-on* application treatment regimes. *Journal of Medical Entomology*, 39(5): 763-769.
- De la Fuente, J. (2003). The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida). *Experimental and Applied Acarology*, 29: 331-344.
- De la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Estrada-Peña, A., Almazán, C., Kocan, K., Martín, M. P., y Gortázar, C. (2004). Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 50(4): 187-196.

- De Prada, J., y Llorente, A. (1950). Primer caso de fiebre Q en España. *Revista Ibérica de Parasitología*, 10(2): 275-279.
- Delibes-Mateos, M., Redpath, S. M., Angulo, E., Ferreras, P., y Villafuerte, R. (2007). Rabbits as a keystone species in southern Europe. *Biological Conservation*, 137(1): 149-156.
- Delibes-Mateos, M., Ferreras, P., y Villafuerte, R. (2009). Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) abundance and protected areas in central-southern Spain: why they do not match? *European Journal of Wildlife Research*, 55(1): 65-69.
- Díaz, A. (2016). *Pisos Bioclimáticos de España según Rivas Martínez (1987)* [Mapa]. Recuperado de <http://biogeografia.net.au.net/bioclimate4a.html>
- Diehl, P. A., Aeschlimann, A., y Obenchain, F. D. (1982). Tick Reproduction: Oogenesis and Oviposition. En F. D. Obenchain y R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks* (Vol. 1, pp. 310-343). Pergamon Press, Oxford.
- Doube, B. M., y Kemp, D. H. (1979). The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. *International journal for parasitology*, 9(5): 449-454.
- Drew, M. L., Samuel, W. M., Lukiwski, G. M., y Willman, J. N. (1985). An Evaluation of Burning for Control of Winter Ticks, *Dermacentor albipictus*, in Central Alberta. *Journal of Wildlife Diseases*, 21(3): 313-315.
- Drummond, R. O. (1983). Chemical control of ticks. *World Animal Review*, 36(19): 28-33.
- Durden, L. A., y Beati, L. (2014). Modern Tick Systematics. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 1, pp. 17-58). Oxford University Press, New York.
- Eisen, L., y Dolan, M. C. (2016). Evidence for Personal Protective Measures to Reduce Human Contact With Blacklegged Ticks and for Environmentally Based Control Methods to Suppress Host-Seeking Blacklegged Ticks and Reduce Infection with Lyme Disease Spirochetes in Tick Vectors and Rodent Reservoirs. *Journal of Medical Entomology*, 53(5): 1063-1092.
- Encinas, A. (2002). Parasitosis de los rumiantes. Parasitosis cutáneas y afines: Garrapatas duras. En M. Cordero del Campillo y F. A. Rojo-Vázquez, *Parasitología Veterinaria* (pp. 420-423). McGraw-Hill, Madrid.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2017). Integrated Pest Management (IPM) Principles [Pesticide Environmental Stewardship Program]. Consultada el 13 de agosto de 2018, de <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>

- Estrada-Peña, A., Osácar, J. J., Gortázar, C., Calvete, C., y Lucientes, J. (1992). An Account of the Ticks of the Northeastern of Spain (Acarina: Ixodidae). *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*, 67(2): 42-49.
- Estrada-Peña, A. (1995). *Catálogo Geográfico de las Garrapatas en la Península Ibérica* (p. 650). Mallinckrodt Veterinary, Madrid.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., y Walker, A. R. (2004a). *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species* (p. 131). University of Zaragoza, Zaragoza.
- Estrada-Peña, A., Martinez, J. M., Sanchez Acedo, C., Quilez, J., y Del Cacho, E. (2004b). Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Medical and veterinary entomology*, 18(4): 387–397.
- Estrada-Peña, A., y Venzal, J. M. (2007). Climate Niches of Tick Species in the Mediterranean Region: Modeling of Occurrence Data, Distributional Constraints, and Impact of Climate Change. *Journal of Medical Entomology*, 44(6): 1130-1138.
- Estrada-Peña, A. (2008). Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitology Research*, 103(S1): 87-95.
- Estrada-Peña, A., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Gortázar, C., y de la Fuente, J. (2008a). Evidence of the Importance of Host Habitat Use in Predicting the Dilution Effect of Wild Boar for Deer Exposure to *Anaplasma* spp. *PLoS ONE*, 3(8) e2999: 1-10.
- Estrada-Peña, A., Horak, I. G., y Petney, T. (2008b). Climate changes and suitability for the ticks *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in Zimbabwe (1974–1999). *Veterinary Parasitology*, 151(2-4): 256-267.
- Estrada-Peña, A., Palomar, A. M., Santibáñez, P., Sánchez, N., Habela, M. A., Portillo, A., Romero, L., y Oteo, J. A. (2012). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(1): 179-180.
- Estrada-Peña, A., y de la Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, 108: 104-128.
- Estrada-Peña, A., y de la Fuente, J. (2018). The fossil record and the origin of ticks revisited. *Experimental and Applied Acarology*, 75(2): 255-261.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2016). *Crimean-Congo haemorrhagic fever in Spain* (Rapid Risk Assessment No. 8, p. 7). Stockholm.

- European Commission. (2008). *Encouraging innovation in biopesticide development*. (New Alert Issue). Science for Environment Policy. Recuperado de http://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/134na5_en.pdf
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP) España. (2018). *Tratamientos Antiparasitarios Externos*. Recuperado de <http://www.esccap.es/tablas-de-antiparasitarios/>
- Falco, R. C., y Fish, D. (1992). A comparison of methods for sampling the deer tick, *Ixodes dammini*, in a Lyme disease endemic area. *Experimental and Applied Acarology*, 14: 165-173.
- Fauna Ibérica. (2018). Fauna Ibérica: Monte Mediterráneo. Consultada el 6 de junio de 2018, de <https://www.faunaiberica.org/categoria?tipo=monte+mediterr%C3%A1neo>
- Fernandes, É. K. K., Angelo, I. C., Rangel, D. E. N., Bahiense, T. C., Moraes, Á. M. L., Roberts, D. W., y Bittencourt, V. R. E. P. (2011). An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 182(2-4): 307-318.
- Fernández, C., Lara, J. M., Troytiño, I., y Louis, M. (2005). Botanigard®, bioinsecticida de última generación para el control de mosca blanca y otros insectos. *PHYTOMA España*, 173: 1-5.
- Fernández de Mera, I. G., Ruiz-Fons, F., de la Fuente, G., Mangold, A. J., Gortázar, C., y De la Fuente, J. (2013). Spotted Fever Group Rickettsiae in Questing Ticks, Central Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7): 1163-1165.
- Ferrarini, S. R., Duarte, M. O., da Rosa, R. G., Rolim, V., Eifler-Lima, V. L., von Poser, G., y Ribeiro, V. L. S. (2008). Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 157(1-2): 149-153.
- Ferreira, C. (2012). European rabbit research in the Iberian Peninsula: state of the art and future perspectives. *European Journal of Wildlife Research*, 58(6): 885-895.
- Field, C. B., Barros, V. R., Mach, K. J., y Mastrandrea, M. D. (2014). Technical Summary. En *Climate Change 2014 – Impacts, Adaptation and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects: Volume I, Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 35-94). Cambridge University Press, Cambridge and New York.

- Fourie, L. J., van der Lingen, F., y Kok, D. J. (1995). Improvement of field sampling methods for adult Karoo paralysis ticks, *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae) through addition of host odour. *Experimental and Applied Acarology*, 19: 93-101.
- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M., y Jongejan, F. (2013). Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4): 595-603.
- Gállego-Berenguer, J. (2007). Artrópodos. Phylum Arthropoda: Clase Arachnida (II). En *Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario* (Segunda Edición, pp. 388-402). Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Galun, R., y Kindler, S. H. (1965). Glutathione as an Inducer of Feeding in Ticks. *Science*, 147(3654): 166-167.
- Gálvez-Bravo, L. (2011). Conejo – *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758). En A. Salvador y J. Cassinello (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles* (p. 25). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Recuperado de <http://www.vertebradosibericos.org>
- García-Romero, C., Valcárcel, F., Corchero, J. M., Olmeda, A. S., y Pérez-Jiménez, J. M. (2000). Contribución al Estudio de las Parasitosis del Ciervo (*Cervus elaphus*) en las provincias de Toledo y Ciudad Real (Castilla-La Mancha, España). *Ecología*, (14): 235-249.
- George, D. R., Finn, R. D., Graham, K. M., y Sparagano, O. A. (2014). Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites and Vectors*, 7(1): 28-39.
- George, J. E. (2000). Present and Future Technologies for Tick Control. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1): 583-588.
- Gherman, C. M., Mihalca, A. D., Dumitrache, M. O., Gyorke, A., Oroian, I., Sandor, M., y Cozma, V. (2012). CO₂ flagging - an improved method for the collection of questing ticks. *Parasites and Vectors*, 5: 125-131.
- Gilbert, L. (2010). Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia*, 162(1): 217-225.
- Gil-Collado, J. (1948). *Ácaros Ixodoideos de España* (p. 52). Revista de Sanidad e Higiene Pública, Madrid.

- Gil-Collado, J. (1961). Las Garrapatas y Chinchorros. En *Insectos y Ácaros de los Animales Domésticos* (pp. 377-429). Salvat Editores S.A., Barcelona.
- Gil-Collado, J., Guillén, J. L., y Zapatero, L. M. (1979). Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). *Revista Ibérica de Parasitología*, 39(1-4): 107-118.
- Gilot, B., Rogers, P., y Lachet, B. (1985). Données biologiques et écologiques sur les tiques de lagomorphes (et plus spécialement celles du lapin de garenne, *Oryctolagus cuniculus* L.) dans les Alpes françaises et leur avant-pays. *Acarología*, 26(4): 335-354.
- Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., y Glazer, I. (2002). The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology*, 28: 283-288.
- Ginsberg, H. S., y Ewing, C. P. (1989). Comparison of Flagging, Walking, Trapping, and Collecting from Hosts as Sampling Methods for Northern Deer Ticks, *Ixodes dammini*, and Lone- Star Ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 7: 313-322.
- Ginsberg, H. S., y Zhioua, E. (1996). Nymphal survival and habitat distribution of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* ticks (Acari: Ixodidae) on Fire Island, New York, USA. *Experimental and Applied Acarology*, 20: 533-544.
- Ginsberg, H. S., Butler, M., y Zhioua, E. (2002). Effect of deer exclusion by fencing on abundance of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) on Fire Island, New York, USA. *Journal of Vector Ecology*, 27(2): 215-221.
- Ginsberg, H. S., Zhioua, E., Mitra, S., Fischer, J., Buckley, P. A., Verret, F., Underwood, H. B., y Buckley, F. G. (2004). Woodland Type and Spatial Distribution of Nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Environmental Entomology*, 33(5): 1266-1273.
- Ginsberg, H. S. (2014). Tick Control: Trapping, Biocontrol, Host Management and Other Alternative Strategies. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 2, pp. 409-444). Oxford University Press, New York.
- Ginsberg, H. S., Bargar, T. A., Hladik, M. L., y Lubelczyk, C. (2017a). Management of Arthropod Pathogen Vectors in North America: Minimizing Adverse Effects on Pollinators. *Journal of Medical Entomology*, 54(6): 1463-1475.
- Ginsberg, H. S., Lee, C., Volson, B., Dyer, M. C., y Lebrun, R. A. (2017b). Relationships Between Maternal Engorgement Weight and the Number, Size, and Fat Content of Larval *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(2): 275-280.

- Gomes, G. A., Monteiro, C. M. de O., Senra, T. de O. S., Zeringota, V., Calmon, F., Matos, R. da S., Daemon, E., Gois, R.W. da S., Santiago, G. M. P., y de Carvalho, M. G. (2012). Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 111(6): 2423-2430.
- González, J. (2015). *Sistema Integrado de Control de Garrapatas en Conejos de Campo*. Comunicación oral presentado en XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, Vitoria-Gasteiz, España.
- Gothe, R. (1987). Tick Pheromones. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54: 439-441.
- Graf, J. F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G. A., Molento, M. B., Bordin, E. L., y Arantes, G. J. (2004). Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129(7): S427-S442.
- Gray, J. S., y Lohan, G. (1982). The development of a sampling method for the tick *Ixodes ricinus* and its use in a redwater fever area. *Annals of Applied Biology*, 101: 421-427.
- Gray, J. S. (1998). The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental and Applied Acarology*, 22(5): 249-258.
- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., y Lindgren, E. (2009). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 593232: 1-12.
- Gray, J. S., Estrada-Peña, A., y Vial, L. (2014). Ecology of Nidicolous Ticks. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 2, pp. 39-60). Oxford University Press, New York.
- Gregorc, A., y Planinc, I. (2002). The Control of Varroa destructor Using Oxalic Acid. *The Veterinary Journal*, 163(3): 306-310.
- Gregorc, A., Alburaki, M., Werle, C., Knight, P. R., y Adamczyk, J. (2017). Brood removal or queen caging combined with oxalic acid treatment to control varroa mites (*Varroa destructor*) in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48(6): 821-832.
- Groff, K., y Bishop, P. (2017). Itching for change: Embracing modern flea and tick product development. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88: 349-355.
- Grosvenor Estate. (2018). La Garganta | Rural Estates | Family Investment Office | Activity | Grosvenor Estate. Consultada el 11 de septiembre de 2017, de

<http://www.grosvenorestate.com/activity/family-investment-office/rural-estates/la-garganta.aspx>

- Guerrero, F. D., Pérez de León, A. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N., Miller, R. J., y Andreotti, R. (2014). Acaricide Research and Development, Resistance, and Resistance Monitoring. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 2, pp. 353-381). Oxford University Press, New York.
- Habela, M. A., Peña, J., Corchero, E., y Sevilla, R. G. (2000). *Garrapatas y hemoparásitos transmitidos de interés veterinario en España. Manual práctico para su identificación* (p.55). Schering Plough, Animal Health. Facultad de Veterinaria de Cáceres.
- Hernández-A, F., Teel, P., Corson, M., y Grant, W. (2000). Simulation of rotational grazing to evaluate integrated pest management strategies for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Venezuela. *Veterinary Parasitology*, 92(2): 139-149.
- Heyne, H., Elliott, E. G. R., y Bezuidenhout, J. D. (1987). Rearing and infection techniques for *Amblyomma* species to be used in heartwater transmission experiments. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54: 461-471.
- Hofmeester, T. R., Sprong, H., Jansen, P. A., Prins, H. H. T., y van Wieren, S. E. (2017). Deer presence rather than abundance determines the population density of the sheep tick, *Ixodes ricinus*, in Dutch forests. *Parasites and Vectors*, 10: 433-440.
- Hoogstraal, H., y Morel, P. C. (1970). *Haemaphysalis (Rhipistoma) hispanica* Gil Collado, a Parasite of the European Rabbit, Redescription of Adults, and Description of Immature Stages (Ixodoidea: Ixodidae). *The Journal of Parasitology*, 56(4): 813-822.
- Hoogstraal, H., y Aeschlimann, A. (1982). Tick-Host Specificity. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, 55: 5-32.
- Hoogstraal, H. (1985). Ticks. En S. M. Gaafar, W. E. Howard, y R. E. Marsh (Eds.), *Parasites, Pests and Predators* (Subseries B: Disciplinary approach, pp. 347-370). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Horak, I. G., y Fourie, L. J. (1991). Parasites of domestic and wild animals in South Africa. XXIX. Ixodid ticks on hares in the Cape Province and on hares and red rock rabbits in the Orange Free State. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 58(4): 261-270.
- Hornbostel, V. L., Ostfeld, R. S., Zhioua, E., y Benjamin, M. A. (2004). Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 41(5): 922-929.

- Hornbostel, V. L., Ostfeld, R. S., y Benjamin, M. A. (2005). Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) engorging on *Peromyscus leucopus*. *Journal of Vector Ecology*, 30: 91-101.
- Hornok, S., y Farkas, R. (2009). Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(1): 41-46.
- Hueli, L. E., y Díaz-Sáez, V. (1987). Ixódidos (Acarina, Ixodidae) parásitos del ciervo (*Cervus elaphus* L.) en Sierra Morena (España). *Revista Ibérica de Parasitología*, 47(3): 309-310.
- International Organization for Biological Control (IOBC). (2018). Consultada el 13 de agosto de 2018, de <http://www.iobc-global.org/index.html>
- Jongejan, F., y Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(Supplement S1): S3-S14.
- Jordan, R. A., Schulze, T. L., y Jahn, M. B. (2007). Effects of Reduced Deer Density on the Abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and Lyme Disease Incidence in a Northern New Jersey Endemic Area. *Journal of Medical Entomology*, 44(5): 752-757.
- Kaaya, G. P., Mwangi, E. N., y Ouna, E. A. (1996). Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67(1): 15-20.
- Kemp, D. H., Koudstaal, D., Roberts, J. A., y Kerr, J. D. (1975). Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology*, 70: 243-254.
- Kemp, D. H., Stone, B. F., y Binnington, K. C. (1982). Tick Attachment and Feeding: Role of the Mouthparts, Feeding Apparatus, Salivary Gland Secretions and the Host Response. En R. Galun y F. D. Obenchain (Eds.), *Physiology of Ticks* (Vol. 1, pp. 119-168). Pergamon Press, Oxford.
- Kiffner, C., Lödige, C., Alings, M., Vor, T., y Rühe, F. (2011). Attachment site selection of ticks on roe deer, *Capreolus capreolus*. *Experimental and Applied Acarology*, 53(1): 79-94.
- Kilpatrick, H. J., Labonte, A. M., y Stafford, K. C. (2014). The Relationship Between Deer Density, Tick Abundance, and Human Cases of Lyme Disease in a Residential Community. *Journal of Medical Entomology*, 51(4): 777-784.
- Kirkland, B. H., Westwood, G. S., y Keyhani, N. O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species

- Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*, 41(4): 705–711.
- Kirkland, B. H., Eisa, A., y Keyhani, N. O. (2005). Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor. *Journal of Medical Entomology*, 42(3): 346–351.
- Klompen, J. S. H., Black IV, W. C., Keirans, J. E., y Oliver Jr, J. H. (1996). Evolution of ticks. *Annual Review of Entomology*, 41(1): 141–161.
- Klompen, J. S. H., Black, W. C., Keirans, J. E., y Norris, D. E. (2000). Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. *Cladistics*, 16(1): 79-102.
- Knight, M. M., Norval, R. A. I., y Rechav, Y. (1978). The Life Cycle of the Tick *Hyalomma marginatum rufipes* Koch (Acarina: Ixodidae) under Laboratory Conditions. *Journal of Parasitology*, 64(1): 143-146.
- Knülle, W., y Rudolph, D. (1982). Humidity Relationships and Water Balance of Ticks. En F. D. Obenchain y R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks* (Vol. 1, pp. 43-70). Pergamon Press, Oxford.
- Köhler, F. E. (1897). Piretro, *Tanacetum cinerariifolium* [Imagen]. Köhler's Medizinal-Pflanzen. Recuperado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tanacetum_cinerariifolium_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-269.jpg
- Kröber, T., y Guerin, P. M. (2007a). An *in vitro* feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science*, 63(1): 17-22.
- Kröber, T., y Guerin, P. M. (2007b). *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology*, 23(9): 445-449.
- Krull, C., Böhme, B., Clausen, P.-H., y Nijhof, A. M. (2017). Optimization of an artificial tick feeding assay for *Dermacentor reticulatus*. *Parasites and Vectors*, 10(1): 60-67.
- Kuhnert, F., Diehl, P.-A., y Guerin, P. M. (1995). The Life Cycle of the Bont Tick *Amblyomma hebraeum* *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 25(8): 887-896.
- Kuhnert, F. (1996). Feeding of Hard Ticks *in vitro*: New Perspectives for Rearing and for the Identification of Systemic Acaricides. *ALTEX*, 13(2): 76-87.
- Kunz, S. E., y Kemp, D. H. (1994). Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 13(4): 1249-1286.
- Lavoipierre, M. M. J. (1965). Feeding Mechanism of Blood-sucking Arthropods. *Nature*, 208: 302-303.

- Levin, M. L. (2018). Tick Control. Consultada el 4 de agosto de 2018, de <https://www.msdtvetmanual.com/integumentary-system/ticks/tick-control>
- Lew-Tabor, A. E., Bruyeres, A. G., Zhang, B., y Rodriguez Valle, M. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick *in vitro* feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(5): 500-510.
- Lighton, J. R., y Fielden, L. J. (1995). Mass scaling of standard metabolism in ticks: a valid case of low metabolic rates in sit-and-wait strategists. *Physiological Zoology*, 68(1): 43–62.
- Little, S. E. (2017). Lotilaner - a novel systemic tick and flea control product for dogs. *Parasites and Vectors*, 10(1): 539-541.
- Maggi, M., Tourn, E., Negri, P., Szawarski, N., Marconi, A., Gallez, L., Medici, S., Ruffinengo, S., Brasesco, C., De Feudis, L., Quintana, S., Sammataro, D., y Eguaras, M. (2016). A new formulation of oxalic acid for *Varroa destructor* control applied in *Apis mellifera* colonies in the presence of brood. *Apidologie*, 47(4): 596-605.
- Manilla, G. (1998). *Fauna d'Italia. Acari: Ixodida*. Calderini, Bologna.
- Mans, B. J., y Neitz, A. W. (2004). Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1): 1-17.
- Mans, B. J., de Klerk, D., Pienaar, R., y Latif, A. A. (2011). *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. *PLoS ONE*, 6(8) e23675: 1-11.
- Mans, B. J., de Klerk, D., Pienaar, R., de Castro, M. H., y Latif, A. A. (2012). The Mitochondrial Genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodidae: Argasidae): Estimation of Divergence Dates for the Major Tick Lineages and Reconstruction of Ancestral Blood-Feeding Characters. *PLoS ONE*, 7(11) e49461: 1-12.
- Mans, B. J., de Castro, M. H., Pienaar, R., de Klerk, D., Gaven, P., Genu, S., y Latif, A. A. (2016). Ancestral reconstruction of tick lineages. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(4): 509-535.
- Maranga, R. O., Hassanali, A., Kaaya, G. P., y Mueke, J. M. (2003). Attraction of *Amblyomma variegatum* (ticks) to the attraction-aggregation-attachment-pheromone with or without carbon dioxide. *Experimental and Applied Acarology*, 29(1-2): 121-130.

- Maranga, R. O., Hassanali, A., Kaaya, G. P., y Mueke, J. M. (2006). Performance of a Prototype Baited-trap in Attracting and Infecting the Tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in Field Experiments. *Experimental and Applied Acarology*, 38(2-3), 211-218.
- Margolis, L., Esch, G. W., Holmes, J. C., Kuris, A. M., y Schad, G. A. (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology*, 68: 131-133.
- Márquez, F. J., y Jiménez Millán, F. (1988). Hacia un modelo de ciclo biológico de *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae). Resultados del muestreo anual de 1986. *Revista Ibérica de Parasitología*, 48(4): 433-443.
- Márquez, F. J. (1989). Dynamique de la Population de *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938 (Acarina, Ixodidae) en 1986-1987 dans le sud-est de l'Espagne: Modélisation du Cycle Biologique. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 64(5): 374-390.
- Márquez, F. J. (1990). Dinámica de la población de *Ixodes ventralis* Gil Collado, 1936 (Acarina, Ixodidae) durante 1986-1987 en el sureste de España. *Revista Ibérica de Parasitología*, 50(1-2): 101-116.
- Márquez, F. J. (1992). Dynamique de la Population de *Haemaphysalis hispanica* (Acarina, Ixodidae) dans le sud-est de L'Espagne. *Vie Milieu*, 42(1): 41-49.
- Márquez, F. J., y Guiguen, C. (1992). Distribution sur l'hôte des Ixodides parasites d'*Oryctolagus cuniculus* (L.) et facteurs qui l'affectent. *Acarología*, 33(2): 141-148.
- Márquez, F. J. (1993). Chronological structure of the Ixodidae parasitocenosis of *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) (Lagomorpha: Leporidae) in a prospected area in the southeast of the Iberian Peninsula. *Research and Reviews in Parasitology*, 53(1-2): 47-52.
- Márquez-Jiménez, F. J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liévana, J. J., y Muniain-Ezcurra, M. A. (2005). Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 23(2): 94-102.
- Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G. A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez, J. M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., y Lugo-Cervantes, E. del C. (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 108(2): 481-487.

- Martins, R. M. (2006). Estudio *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *A Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(2): 71-78.
- Mather, T. N., Ribeiro, J. M. C., y Spielman, A. (1987). Lyme Disease and Babesiosis: Acaricide Focused on Potentially Infected Ticks. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 36(3): 609-614.
- McMahon, C., y Guerin, P. M. (2002). Attraction of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*, to human breath and to the breath components acetone, NO and CO₂. *Naturwissenschaften*, 89(7): 311-315.
- McTier, T. L., Chubb, N., Curtis, M. P., Hedges, L., Inskip, G. A., Knauer, C. S., Menon, S., Mills, B., Pullins, A., Zinser, E., Woods, D. J., y Meeus, P. (2016). Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Veterinary Parasitology*, 222: 3-11.
- Mekonnen, S., Bryson, N. R., Fourie, L. J., Peter, R. J., Spickett, A. M., Taylor, R. J., Strydom, T., y Horak, I. G. (2002). Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 69: 99-105.
- Mierzejewska, E. J., Alsarraf, M., Behnke, J. M., y Bajer, A. (2015). The effect of changes in agricultural practices on the density of *Dermacentor reticulatus* ticks. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4): 259-265.
- Millán, J., Ruiz-Fons, F., Márquez, F. J., Viota, M., López-Bao, J., y Paz Martín-Mateo, M. (2007). Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(3): 248-254.
- Millins, C., Gilbert, L., Medlock, J., Hansford, K., Thompson, D. B., y Biek, R. (2017). Effects of conservation management of landscapes and vertebrate communities on Lyme borreliosis risk in the United Kingdom. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1722) 20160123: 1-12.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (2018). Recomendaciones para prevenir enfermedades por picadura de garrapatas. Recuperado el 9 de septiembre de 2018, de <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017992.pdf>
- Montoya, M., y Mesón, M. (2010a). Sus Cados o Madrigueras. En *El Conejo de monte: vida, costumbres y fomento* (pp. 25-41). Fundación Conde del Valle de Salazar, Editorial Solitario, Madrid.

- Montoya, M., y Mesón, M. (2010b). Nuestra Especie. En *El Conejo de monte: vida, costumbres y fomento* (pp. 13-24). Fundación Conde del Valle de Salazar, Editorial Solitario, Madrid.
- Montoya, M., y Mesón, M. (2010c). Otros Usos de la Vegetación. En *El Conejo de monte: vida, costumbres y fomento* (pp. 97-106). Fundación Conde del Valle de Salazar, Editorial Solitario, Madrid.
- Montoya, M., y Mesón, M. (2010d). Celo, Reproducción y Crianza. En *El Conejo de monte: vida, costumbres y fomento* (pp. 41-54). Fundación Conde del Valle de Salazar, Editorial Solitario, Madrid.
- Moore, C. G., y Gage, K. L. (2004). Surveillance of Vector-Borne Diseases. En W. H. Marquardt (Ed.), *Biology of Disease Vectors* (Second edition, pp. 257-276). Elsevier Academic Press.
- Mwangi, E. N., Hassan, S. M., Kaaya, G. P., y Essuman, S. (1997). The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya. *Experimental and Applied Acarology*, 21: 177-126.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018). Taxonomy Browser. Consultada el 13 de mayo de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefyid=29730&ylvl=3ylin=fykeep=1ysrchmode=1yunlock>
- National Pesticide Telecommunications Network (NPTN). (1998). *Cypermethrin* (Regulated by the U.S. Environmental Protection Agency) (p. 4). Oregon State University, Corvallis. Recuperado de <http://npic.orst.edu/factsheets/cypermethrin.pdf>
- Neem Foundation. (2018). Neem. History of Usage. Consultada el 13 de agosto de 2018, de <http://www.neemfoundation.org/about-neem/history-of-usage/>
- Ogden, N. H., y Lindsay, L. R. (2016). Effects of Climate and Climate Change on Vectors and Vector-Borne Diseases: Ticks Are Different. *Trends in Parasitology*, 32(8): 646-656.
- Oliver Jr, J. H. (1982). Tick Reproduction: Sperm Development and Cytogenetics. En F. D. Obenchain y R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks* (Vol. 1, pp. 245-275). Pergamon Press, Oxford.
- Olmeda García, Á. S. (1992). *Transmisión experimental de Dipetalonema dracunculoides (Cobbold 1870) por Rhipicephalus sanguineus (Latreille 1806)*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

- Olmeda, A. S., Pérez, J. L., Martín-Hernández, R., Torrente, M., y Valcárcel, F. (2008). Toxicity of Oxalic Acid Against Adult *Hyalomma lusitanicum* Ticks (Ixodida: Ixodidae) in Laboratory Conditions: LD50. *Journal of Medical Entomology*, 45(4): 715-719.
- Ortiz de Elguea-Culebras, G., Sánchez-Vioque, R., Berruga, M. I., Herraiz-Peñalver, D., González-Coloma, A., Andrés, M. F., y Santana-Méridas, O. (2018). Biocidal Potential and Chemical Composition of Industrial Essential Oils from *Hyssopus officinalis*, *Lavandula × intermedia* var. SUPER., and *Santolina chamaecyparissus*. *Chemistry y Biodiversity*, 15(1) e1700313: 1-9.
- Ostfeld, R. S., Canham, C. D., Oggenfuss, K., Winchcombe, R. J., y Keesing, F. (2006). Climate, Deer, Rodents, and Acorns as Determinants of Variation in Lyme-Disease Risk. *PLoS Biology*, 4(6) e145: 1058-1068.
- Ouhelli, H., y Pandey, V. S. (1984). Development of *Hyalomma lusitanicum* under laboratory conditions. *Veterinary parasitology*, 15(1): 57–66.
- Ouhelli, H. (1994). Comparative development of *Hyalomma marginatum* (Schulze, 1919), *H. anatolicum excavatum* (Koch, 1844), *H. lusitanicum* (Koch, 1884) and *H. dromedarii* (Koch, 1844) under laboratory conditions. *Acta Parasitologica*, 39(3): 153-157.
- Pegram, R. G., Rota, A., Onkelinx, R., Wilson, D. D., Bartlette, P., Nisbett, B. S., Swanston, G., Vanterpool, P., y de Castro, J. J. (1996). Eradicating the tropical bont tick from the Caribbean. *World Animal Review: A Quarterly Journal on Animal Health, Production and Products*, 87: 56-65. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/W2650T/w2650t06.htm>
- Peñalver, E., Arillo, A., Delclòs, X., Peris, D., Grimaldi, D. A., Anderson, S. R., Nascimbene, P. C., y Pérez-de la Fuente, R. (2017). Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. *Nature Communications*, 8(1) 1924: 1-13.
- Perez-Cogollo, L. C., Rodriguez-Vivas, R. I., Ramirez-Cruz, G. T., y Rosado-Aguilar, J. A. (2010). Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 172(1-2): 109-113.
- Pérez de Ayala, R. (2017). *El conejo silvestre en España. Biología, gestión y fomento de sus poblaciones*. (p. 53). WWF España.
- Perinotto, W. M. S., Angelo, I. C., Golo, P. S., Quinelato, S., Camargo, M. G., Sá, F. A., y Bittencourt, V. R. E. P. (2012). Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*, 130(3): 257-260.

- Perkins, S. E., Cattadori, I. M., Tagliapietra, V., Rizzoli, A. P., y Hudson, P. J. (2006). Localized Deer Absence Leads to Tick Amplification. *Ecology*, 87(8): 1981-1986.
- Petro, Y., Kasege, P., Kilasara, D., Kawiche, E., Temba, V., Kaunda, E., y Sungi, I. (2012). The Efficacy of Cypermethrin (Vapco Cypermethrin ® 10 EC) Against Cattle Ticks in Tanzania. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 2(11): 98-105.
- Pierce, A. E., y Pierce, M. H. (1956). A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embryonated hen egg. *Australian Veterinary Journal*, 32: 144-146.
- Pound, J. M., Miller, J. A., George, J. E., y Lemeilleur, C. A. (2000). The «4-poster» passive topical treatment device to apply acaricide for controlling ticks (Acari: Ixodidae) feeding on white-tailed deer. *Journal of Medical Entomology*, 37(4): 588-594.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A. A., Ortiz-Urquiza, A., y Santiago-Álvarez, C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, 111(8): 947-966.
- Quesada-Moraga, E., y Santiago-Álvarez, C. (2008). Hongos Entomopatógenos. En J. A. Jacas y A. Urbaneja, *Control Biológico de Plagas Agrícolas* (pp. 98-120). S.L. MV PHYTOMA-ESPAÑA, Valencia.
- Randolph, S. E. (2004). Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, 129(S1): S37–S65.
- Randolph, S. E. (2014). Ecology of Non-Nidicolous Ticks. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 2, pp. 3-38). Oxford University Press, New York.
- Rau, U. (1965). Some Observations on the Feeding of Ticks on Experimental Animals with Special Reference to the Pill Box Method. *Journal of Medical Entomology*, 2(1): 58-60.
- Rees, H. H. (2008). Endocrinology of tick development and reproduction. En A. S. Bowman y P. Nuttall (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control* (pp. 143-165). Cambridge University Press, Cambridge.
- Reis, R. C. S., Fernandes, É. K. K., y Bittencourt, V. R. E. P. (2008). Fungal Formulations to Control *Rhipicephalus sanguineus* Engorged Females. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1): 239-241.
- Ren, Q., Sun, M., Guan, G., Li, Y., Liu, Z., Liu, A., Ma, M., Niu, Q., Liu, J., Yin, H., y Luo, J. (2011). Biological control of engorged female *Haemaphysalis qinghaiensis* (Acari:

- Ixodidae) ticks with different Chinese isolates of *Beauveria bassiana*. *Parasitology Research*, 109(4): 1059-1064.
- Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Sun, M., Ma, M., Niu, Q., Li, Y., Liu, A., Liu, J., Yang, J., Yin, H., y Luo, J. (2012). Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control*, 63(2): 98-101.
- Requena-García, F., Cabrero-Sañudo, F., Olmeda-García, S., González, J., y Valcárcel, F. (2017). Influence of environmental temperature and humidity on questing ticks in central Spain. *Experimental and Applied Acarology*, 71(3): 277-290.
- Ribeiro, C. C. D. U., de Azevedo Baêta, B., de Almeida Valim, J. R., Teixeira, R. C., Cepeda, P. B., da Silva, J. B., y da Fonseca, A. H. (2014). Use of plastic tips in artificial feeding of *Dermacentor (Anocentor) nitens* females Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(6): 689-692.
- Ribeiro, J. M. C. (1995). Blood-Feeding Arthropods: Live Syringes or Invertebrate Pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, 4: 143-152.
- Rivas-Martínez, S. (1987). Región Mediterránea. En S. Rivas-Martínez, *Memoria del Mapa de Series de Vegetación de España* (pp. 89-129). Instituto para la Conservación de la Naturaleza (ICONA). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Rodríguez Rodríguez, J. A. (1980). *Estudio de Ectoparásitos de Lepóridos de la provincia de Ciudad Real*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Rodríguez, J. A., Zapatero, L. M., y Sánchez-Covisa, A. (1981). Variación estacional de Ixodidae y Siphonaptera de lepóridos en la provincia de Ciudad Real. *Revista Ibérica de Parasitología*, 41(4): 527-538.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., y Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1): 3-29.
- Romano, D., Stefanini, C., Canale, A., y Benelli, G. (2018). Artificial blood feeders for mosquito and ticks—Where from, where to? *Acta Tropica*, 183: 43-56.
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., de la Fuente, J., y Gortazár, C. (2006). Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: Geographical and temporal distribution. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2): 133-142.

- Ruiz-Fons, F., y Gilbert, L. (2010). The role of deer as vehicles to move ticks, *Ixodes ricinus*, between contrasting habitats. *International Journal for Parasitology*, 40(9): 1013-1020.
- Ruiz-Fons, F., Acevedo, P., Sobrino, R., Vicente, J., Fierro, Y., y Fernández-de-Mera, I. G. (2013). Sex-biased differences in the effects of host individual, host population and environmental traits driving tick parasitism in red deer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(23): 1-12.
- Ruiz-Vásquez, L., Olmeda, A. S., Zúñiga, G., Villarroel, L., Echeverri, L. F., González-Coloma, A., y Reina, M. (2017). Insect Antifeedant and Ixodocidal Compounds from *Senecio adenotrichius*. *Chemistry y Biodiversity*, 14(1) e1600155: 1-9.
- Rulison, E. L., Kuczaj, I., Pang, G., Hickling, G. J., Tsao, J. I., y Ginsberg, H. S. (2013). Flagging versus dragging as sampling methods for nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Vector Ecology*, 38(1): 163-167.
- Rutledge, L. C., Ward, R. A., y Gould, D. J. (1964). Studies on the Feeding Response of Mosquitoes to Nutritive Solutions in a New Membrane Feeder. *Mosquito News*, 24(4): 407-419.
- Samish, M., y Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44(1): 159-182.
- Samish, M., Ginsberg, H., y Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, 129(7): S389-S403.
- Samish, M., Ginsberg, H., y Glazer, I. (2008). Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. En A. S. Bowman y P. Nuttall (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control* (pp. 447-469). Cambridge University Press, Cambridge.
- Samish, M., Rot, A., Ment, D., Barel, S., Glazer, I., y Gindin, G. (2014). Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 206(3-4): 258-266.
- Sands, A. F., Apanaskevich, D. A., Matthee, S., Horak, I. G., Harrison, A., Karim, S., Mohammad, M. K., Mumcuoglu, K. Y., Rajakaruna, R., Santos-Silva, M. M., y Matthee, C. A. (2017). Effects of tectonics and large scale climatic changes on the evolutionary history of *Hyalomma* ticks. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 114: 153-165.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., y Bacellar, F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and

- known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1): 85-121.
- Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35: 271-297.
- Schoeler, G. B., y Wikel, S. K. (2001). Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 95(8): 755-771.
- Schulze, T. L., Jordan, R. A., y Hung, R. W. (1995). Suppression of Subadult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Following Removal of Leaf Litter. *Journal of Medical Entomology*, 32(5): 730-733.
- Schulze, T. L., y Jordan, R. A. (2005). Influence of Meso- and Microscale Habitat Structure on Focal Distribution of Sympatric *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 42(3): 285-294.
- Schwan, E. V., Hutton, D., Shields, K. J. B., y Townson, S. (1991). Artificial feeding and successful reproduction in *Ornithodoros moubata moubata* (Murray, 1877) (Acarina: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology*, 13: 107-115.
- Shoop, W. L., Hartline, E. J., Gould, B. R., Waddell, M. E., McDowell, R. G., Kinney, J. B., Lahm, G. P., Long, J. K., Xu, M., Wagerle, T., Jones, G. S., Dietrich, R. F., Cordova, D., Schroeder, M. E., Rhoades, D. F., Benner, E. A., y Confalone, P. N. (2014). Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Veterinary Parasitology*, 201(3-4): 179-189.
- Šimo, L., Kocáková, P., Sláviková, M., Kubeš, M., Hajnická, V., Vančová, I., y Slovák, M. (2004). *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodidae) female feeding in laboratory. *Biologia, Bratislava*, 59(5): 655-660.
- Snowwhiteimages©. (2012). *Azadirachta indica* - hojas y flores de Neem en blanco [Imagen]. Recuperado de <https://es.dreamstime.com/imagenes-de-archivo-azadirachta-indica-hojas-de-neem-image25129734>
- Snyder, D. E., Cruthers, L. R., y Slone, R. L. (2009). Preliminary study on the acaricidal efficacy of spinosad administered orally to dogs infested with the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 166(1-2): 131-135.
- Sobradillo, V., Ansola, P., y Baranda, F. (1986). Neumonía por fiebre Q en España. *Archivos de Bronconeumología*, 22(5): 39-46.

- Sobrino, R., Millán, J., Oleaga, Á., Gortázar, C., de la Fuente, J., y Ruiz-Fons, F. (2012). Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4): 248-257.
- Solberg, V. B., Neidhardt, K., Sardelis, M. R., Hildebrandt, C., Hoffmann, F. J., y Boobar, L. R. (1992). Quantitative Evaluation of Sampling Methods for *Ixodes dammini* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 29(3): 451-456.
- Sonenshine, D. E. (1993). *Biology of Ticks* (Vol. 2, p. 488). Oxford University Press, New York.
- Sonenshine, D. E., Adams, T., Allan, S. A., McLaughlin, J., y Webster, F. X. (2003). Chemical composition of some components of the arrestment pheromone of the black-legged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and their use in tick control. *Journal of Medical Entomology*, 40(6): 849-859.
- Sonenshine, D. E. (2004). Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitology*, 129(7): S405-S425.
- Sonenshine, D. E. (2006). Tick pheromones and their use in tick control. *Annual Review of Entomology*, 51(1): 557-580.
- Sonenshine, D. E. (2009). Ticks. En V. H. Resh y R. T. Cardé (Eds.), *Encyclopedia of Insects* (Second Edition, pp. 1003-1011). Elsevier Academic Press.
- Sonenshine, D. E., y Roe, R. M. (2014). External and Internal Anatomy of Ticks. En D. E. Sonenshine y R. M. Roe (Eds.), *Biology of Ticks* (Second Edition, Vol. 1, pp. 74-98). Oxford University Press, New York.
- Soriguer, R. C. (1980a). El conejo, *Oryctolagus cuniculus* (L.), en Andalucía Occidental: Parámetros corporales y curva de crecimiento. *Doñana, Acta Vertebrata*, 7(1): 83-90.
- Soriguer, R. C. (1980b). Ciclo anual de parasitismo por pulgas y garrapatas en el conejo de campo (*Oryctolagus cuniculus* L.) en Andalucía Occidental, España. *Revista Ibérica de Parasitología*, 40: 539-550.
- Soriguer, R. (1981). Biología y Dinámica de una población de Conejos (*Oryctolagus cuniculus* L.) de Andalucía Occidental. *Doñana, Acta Vertebrata*, 8(Número Especial): 1-379.
- Soriguer, R. C., y Palacios, F. (1994). Los lagomorfos ibéricos: liebres y conejos. En Colegio Oficial de Biólogos (Ed.), *Curso de gestión y ordenación cinegética* (pp. 63-82). Junta de Andalucía.

- Sousa, L. A. D., Pires Júnior, H. B., Soares, S. F., Ferri, P. H., Ribas, P., Lima, E. M., Furlong, J., Bittencourt, V. R. E. P., Perinotto, W. M. de S., y Borges, L. M. F. (2011). Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4): 320-324.
- SPSS Inc. (2011). IBM SPSS Statistics 20 (Versión 20). IBM Company. Armonk, New York.
- Stafford, K. C. (1993). Reduced Abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with Exclusion of Deer by Electric Fencing. *Journal of Medical Entomology*, 30(6): 986-996.
- Stafford, K. C., Ward, J. S., y Magnarelli, L. A. (1998). Impact of Controlled Burns on the Abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 35(4): 510-513.
- Stafford, K. C., y Allan, S. A. (2010). Field Applications of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the Control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 47(6): 1107-1115.
- Stafford, K. C., Williams, S. C., y Molaei, G. (2017). Integrated Pest Management in Controlling Ticks and Tick-Associated Diseases. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1)28: 1-7.
- Stone, B. F., Commins, M. A., y Kemp, D. H. (1983). Artificial Feeding of the Australian Paralysis Tick, *Ixodes holocyclus* and Collection of Paralysing Toxin. *International Journal for Parasitology*, 13(5): 447-454.
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Liu, Z., Ma, M., Gou, H., Chen, Z., Li, Y., Liu, A., Niu, Q., Yang, J., Yin, H., y Luo, J. (2011). Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 180(3-4): 389-393.
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Li, Y., Han, X., Ma, C., Yin, H., y Luo, J. (2013). Effectiveness of *Beauveria bassiana sensu lato* strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International*, 62(5): 412-415.
- Tack, W., Madder, M., Baeten, L., Vanhellemont, M., Gruwez, R., y Verheyen, K. (2012). Local habitat and landscape affect *Ixodes ricinus* tick abundances in forests on poor, sandy soils. *Forest Ecology and Management*, 265: 30-36.

- Tajeri, S., y Razmi, G. R. (2011). *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) imbibe bovine blood *in vitro* by utilizing an artificial feeding system. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4): 332-335.
- Takiguchi, Y., Mishima, H., Okuda, M., y Terao, M. (1980). Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: Fermentation, isolation and physico-chemical properties. *The Journal of Antibiotics*, 33(10): 1120-1127.
- Tälleklint-Eisen, L., y Lane, R. S. (2000). Efficiency of Drag Sampling for Estimating Population Sizes of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) Nymphs in Leaf Litter. *Journal of Medical Entomology*, 37(3): 484-487.
- Tellería, J. L. (2010). Distribución, biología y conservación de los ciervos (Familia Cervidae en España). En S. Hernández Rodríguez, M. R. Hidalgo Argüello, y C. De la Fuente López (Eds.), *Parasitosis de Animales Silvestres y Ambiente Sostenible. La Interfaz Animal Silvestre / Animal Doméstico*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Terassini, F. A., Barbieri, F. S., Albuquerque, S., Szabó, M. P. J., Camargo, L. M. A., y Labruna, M. B. (2010). Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1(4): 194-196.
- Theiler, A. (1912). The immunisation of cattle against East Coast fever. *Second Report of the Director of Veterinary Research*: 216-314.
- Toledo, A., Jado, I., Olmeda, A. S., Casado-Nistal, M. A., Gil, H., Escudero, R., y Anda, P. (2009a). Detection of *Coxiella burnetii* in Ticks Collected from Central Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(5): 465-468.
- Toledo, Á., Olmeda, A. S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M. A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H., y Anda, P. (2009b). Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(1): 67-74.
- Totze, R. (1933). Beiträge zur Sinnesphysiologie der Zecken. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 19(1): 110-161.
- Troughton, D. R., y Levin, M. L. (2007). Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44(5): 732-740.
- University of Rhode Island. (2018). TickEncounter Resource Center. Recuperado el 13 de agosto de 2018, de https://tickencounter.org/prevention/mouse_targeted_devices

- Uspensky, I., e Ioffe-Uspensky, I. (1999). The relationship between engorged female weight and egg number in ixodid ticks: a biological interpretation of linear regression parameters. *Acarologia*, XL(1): 9-17.
- Uspensky, I. (2002). Preliminary Observations on Specific Adaptations of Exophilic Ixodid Ticks to Forests or Open Country Habitats. *Experimental and Applied Acarology*, 28(1-4): 147-154.
- Valcárcel, F., García Romero, C., Corchero, J., Pérez, J. M., Caride, E., y Olmeda, A. S. (1999). *Datos preliminares sobre los artrópodos del ciervo (Cervus elaphus) en la provincia de Ciudad Real*. Comunicación oral presentado en VI Congreso Ibérico de Parasitología, Córdoba.
- Valcárcel, F., Sánchez, J., Jaime, J., Basco-Basco, P., Guajardo, S., Cutuli, M.-T., Martín-Hernández, R., y Olmeda, A.-S. (2014). Control of Host-seeking Adults of *Hyalomma lusitanicum* with Oxalic Acid under Field Conditions. *International Journal of Veterinary Medicine: Research y Reports*, 871622: 1-9.
- Valcárcel, F., Sánchez, J. L. P., Jaime, J. M. T., Basco-Basco, P. I., Guajardo, S. C. C., Cutuli, M. T., González, J., y Olmeda, A. S. (2015). Control of Tick Infestations in *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) With Spinosad Under Laboratory and Field Conditions. *Journal of Medical Entomology*, 52(2): 207-213.
- Valcárcel, F. (2017). *A new method of tick control under field conditions*. Comunicación oral presentado en XX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, Tenerife.
- Varela-Castro, L., Zuddas, C., Ortega, N., Serrano, E., Salinas, J., Castellà, J., Castillo-Contreras, R., Carvalho, J., y Mentaberre, G. (2018). On the possible role of ticks in the eco-epidemiology of *Coxiella burnetii* in a Mediterranean ecosystem. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(3): 687-694.
- Vassallo, M., Pichon, B., Cabaret, J., Figureau, C., y Pérez-Eid, C. (2000). Methodology for Sampling Questing Nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the Principal Vector of Lyme Disease in Europe. *Journal of Medical Entomology*, 37(3): 335-339.
- Virgós, E., Cabezas-Díaz, S., y Lozano, J. (2007). Is the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) a threatened species in Spain? Sociological constraints in the conservation of species. *Biodiversity and Conservation*, 16(12): 3489-3504.
- Viseras, J., Hueli, L. E., Adroher, F. J., y García-Fernández, P. (1999). Studies on the Transmission of *Theileria annulata* to Cattle by the Tick *Hyalomma lusitanicum*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 46(8): 505-509.

- Voigt, W. P., Young, A. S., Mwaura, S. N., Nyaga, S. G., Njihia, G. M., Mwakima, F. N., y Morzaria, S. P. (1993). *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology*, 107: 257-263.
- Waladde, S. M., Kemp, D. H., y Rice, M. J. (1979). Feeding Electrograms and Fluid Uptake Measurements of Cattle Tick *Boophilus microplus* Attached on Artificial Membranes. *International Journal for Parasitology*, 9: 89-95.
- Waladde, S. M., y Rice, M. J. (1982). The Sensory Basis of Tick Feeding Behaviour. En F. D. Obenchain y R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks* (Vol. 1, pp. 72-113). Pergamon Press, Oxford.
- Waladde, S. M., Young, A. S., Ochieng, S. A., Mwaura, S. N., y Mwakima, F. N. (1993). Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphae *in vitro* on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology*, 107: 249-256.
- Waladde, S. M., Young, A. S., y Morzaria, S. P. (1996). Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitology Today*, 12(7): 272-278.
- Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J. L., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Latif, A. A., Pegram, R. G., y Preston, P. M. (2003). *Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species*. Bioscience Reports, Edinburgh.
- Wall, R., y Shearer, D. (2001). Ticks (Acari). En *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control* (Second edition, pp. 55-82). Blackwell Science, Oxford.
- Weber, T., y Selzer, P. M. (2016). Isoxazolines: A Novel Chemotype Highly Effective on Ectoparasites. *ChemMedChem*, 11(3): 270-276.
- Webster, A., Reck, J., Santi, L., Souza, U. A., Dall'Agnol, B., Klafke, G. M., Beys-da-Silva, W. O., Martins, J. R., y Schrank, A. (2015). Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 207(3-4): 302-308.
- Wetzel, H. (1979). Artificial membrane for *in vitro* feeding of piercing-sucking arthropods. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 25(1): 117-119.
- Wharton, R. H. (1983). Acaricide resistance and alternative methods of tick control. *World Animal Review*, 36(20): 34-41.

- White, A., y Gaff, H. (2018). Review: Application of Tick Control Technologies for Blacklegged, Lone Star, and American Dog Ticks. *Journal of Integrated Pest Management*, 9(1) 12: 1-10.
- Wikel, S. K. (1999). Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International journal for parasitology*, 29(6): 851–859.
- Wilson, M. L., Levine, J. F., y Spielman, A. (1984). Effect of Deer Reduction on Abundance of the Deer Tick (*Ixodes dammini*). *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 57: 697-705.
- Wilson, M. L., Gregory, H. A., y Spielman, A. (1985). Correlation Between Abundance of Deer and That of the Deer Tick, *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *Annals of the Entomology Society of America*, 78: 172-176.
- Wilson, M. L. (1986). Reduced Abundance of Adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) Following Destruction of Vegetation. *Journal of Economic Entomology*, 79(3): 693-696.
- Wilson, M. L. (1994). Population Ecology of Tick Vectors: Interaction, Measurement, and Analysis. En D. E. Sonenshine y T. N. Mather, *Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses* (pp. 27-31). Oxford University Press, New York.
- Wong, T. J., Schramm, P. J., Foster, E., Hahn, M. B., Schafrick, N. H., Conlon, K. C., y Cameron, L. (2018). The Effectiveness and Implementation of 4-Poster Deer Self-Treatment Devices for Tick-borne Disease Prevention. A Potential Component of an Integrated Tick Management Program [Guidance and Trainings]. Recuperado el 13 de agosto de 2018, de https://www.cdc.gov/climateandhealth/docs/Effectiveness4PosterDevices_508.pdf
- Yeruham, I., Hadani, A., y Galkner, F. (2000). The life cycle of *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1877 (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions. *Veterinary parasitology*, 89(1): 109–116.
- Yessinou, R. E., Akpo, Y., Sidick, A., Adoligbe, C., Youssao Abdou Karim, I., Akogbeto, M., y Farougou, S. (2018). Evidence of multiple mechanisms of alphacypermethrin and deltamethrin resistance in ticks *Rhipicephalus microplus* in Benin, West Africa. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(3): 665-671.
- Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P. W., Ginsberg, H. S., y LeBrun, R. A. (1997). Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, 83(5): 815-818.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6): 553-596.

10. Anexos

Ficha de muestreos en vegetación

MUESTREO MENSUAL DE VEGETACIÓN "LA GARGANTA"						
FECHA	punto 1 OLIVAR	punto 2 PRESIDENTE	punto 3 MALPARÍO	punto 4 LOMA DE AMBROSIO	punto 5 MATASHERMOSAS	punto 6 TEJONERAS
Hora Inicio						
Hora Final						
Nº Mantas						
HR SUELO (%)						
Tº SUELO (°C)						
Tº AMBIENTE (°C)						
HR AMBIENTE (%)						
VEGETACIÓN (alta, media, baja)						
SOL/NUBES						
VIENTO (m/s)						
Observaciones						
RESULTADOS						
TOTAL						

- 206 -

Ficha de Alimentación Artificial de Garrapatas

SEGUIMIENTO ALIMENTACIÓN *in vitro* DE GARRAPATAS (AIV)

Inicio AIV:

Inicio AIV:
Unidad de Alimentación:

Final AIV:
Membrana:

[illegible]

Observaciones:

[illegible]

